

Uniwersytet Warszawski

Wydział Chemii

# ROZPRAWA DOKTORSKA

KAMIL JATCZAK

OTRZYMYWANIE NOWYCH, WIELOFUNKCYJNYCH POCHODNYCH  
 $\beta$ -AMYRYNY Z TRADYCYJNEGO SUROWCA ROŚLINNEGO,  
POPRZEZ SELEKTYWNĄ FUNKCJONALIZACJĘ PROTOESCYGENINY

Promotor:

Prof. dr hab. Grzegorz Grynkiewicz

Promotor pomocniczy:

Dr Marcin Cybulski

WARSZAWA 2015

*Serdeczne podziękowania dla mojego Promotora  
Pana prof. dr hab. Grzegorza Gryniewiczza  
za bodziec do stworzenia niniejszej pracy  
oraz wszechstronną pomoc w trakcie jej realizacji*

*Dziękuję Panu dr Marcinowi Cybulskiemu  
za konsultacje, obiektywizm i dobre rady*

*Dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Chemii oraz Analityki badawczej IF  
za atmosferę oraz pomoc w realizacji zaprezentowanych badań*

*Pracę dedykuję żonie Marcie i córeczce Julii,  
które były moją największą motywacją i największym wsparciem*

## **Spis treści**

<b>1 WSTĘP .....</b>	<b>1</b>
<b>2 CEL PRACY.....</b>	<b>3</b>
<b>2 CZĘŚĆ LITERATUROWA .....</b>	<b>5</b>
2.1 TRÓJTERPENY – POCHODZENIE I ROLA .....	6
2.2 KOMPLEKSOWE BADANIA NAD SAPONINĄ OSW-1 JAKO WZÓR DO NAŚLADOWANIA .....	10
2.3 ESCYNA – STRUKTURA MIESZANINY SAPONIN .....	16
2.3.1 <i>Escyna – fitofarmakologia i zastosowania kliniczne</i> .....	18
2.4 REAKTYWNOŚĆ GRUPY HYDROKSYLOWEJ W UKŁADACH POLIHIDROKSYLOWYCH .....	24
2.5 METODOLOGIA GRUP ZABEZPIEZAJĄCYCH W CHEMII POLIHIDROKSYLOWYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH .....	31
2.5.1 <i>Pozycja grup zabezpieczających we współczesnej syntezie organicznej</i> .....	31
2.5.2 <i>Grupy zabezpieczające dla grupy hydroksylowej (oraz dioli, trioli etc.)</i> .....	32
<b>3 BADANIA WŁASNE .....</b>	<b>34</b>
3.1 POZYSKANIE ZWIĄZKU WYJŚCIOWEGO – PROTOESCYGENINY Z NATURALNEJ MIESZANINY SAPONIN – ESCYNY .....	34
3.2 TRIAZOLOWE POCHODNE PROTOESCYGENINY .....	37
3.2.1 <i>Etery propargilowe</i> .....	37
3.2.2 <i>Reakcja dipolarnej 1,3-cykloaddycji Huisgena</i> .....	39
3.2.2.1 <i>Azydki aromatyczne i sacharydowe</i> .....	40
3.2.2.2 <i>Azydki alkilofosfoniowe</i> .....	41
3.2.3 <i>Selektywne usunięcie grup zabezpieczających</i> .....	42
3.3 W JAKI SPOSÓB NAŚLADOWAĆ NATURĘ, CZYLI MIMETYKI ESCYNY .....	47
3.3.1 <i>Ścieżka 1. – przez O,O-diizopropylidenoproteoscygeninę</i> .....	48
3.3.1.1 <i>Ketalizacja proteoscygeniny</i> .....	48
3.3.1.2 <i>Zabezpieczenie grupy hydroksylowej w pozycji C28</i> .....	51
3.3.1.3 <i>Selektywne odbezpieczenie grup izopropylidenowych</i> .....	55
3.3.1.4 <i>Zabezpieczenie grupy hydroksylowej w pozycji C24</i> .....	57
3.3.1.5 <i>Funkcjonalizacja grupy hydroksylowej w pozycji C3</i> .....	60
3.3.2 <i>Ścieżka 2. – disililoproteoscygenina</i> .....	62
3.3.2.1 <i>Sililowe etery I-rzędowych grup hydroksylowych</i> .....	62
3.3.2.2 <i>Acetonidowanie eterów sililowych</i> .....	64
3.3.2.3 <i>Funkcjonalizacja grupy hydroksylowej w pozycji C3</i> .....	66
3.4 PRÓBY SELEKTYWNEGO WPROWADZENIA INNYCH GRUP FUNKCYJNYCH W MIEJSCE GRUPY HYDROKSYLOWEJ .....	67
3.4.1 <i>Bezpośrednie transformacje grupy hydroksylowej</i> .....	68
3.4.1.1 <i>Halogenki i pseudohalogenki</i> .....	68
3.4.1.2 <i>Próby utleniania grupy hydroksylowej</i> .....	70
3.4.2 <i>Wykorzystanie alifatycznych łączników do wprowadzenia nowej grupy funkcyjnej</i> .....	71

3.4.3 Próby wytworzenia układu 16,21-anhydro .....	74
3.5 BADANIA STRUKTURALNE I FIZYKOCHEMICZNE .....	76
3.5.1 Analiza form polimorficznych protoescygeniny. ....	77
3.5.1.1 Analiza XRPD .....	79
3.5.1.2 IR i spektroskopia Ramana .....	80
3.5.1.3 TGA i DSC .....	82
3.5.1.4 Analiza rentgenostrukturalna monokryształu .....	88
3.5.1.5 Ogląd mikroskopowy SEM .....	90
3.5.2 Analiza form polimorficznych 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-protoescygeniny. ....	91
3.5.2.1 Analiza XRPD .....	92
3.5.2.2 Spektroskopia IR i Ramana .....	94
3.5.2.3 TGA i DSC .....	95
3.5.2.4 Analiza rentgenostrukturalna solwatu z etanolem .....	97
3.5.2.5 Ogląd mikroskopowy SEM .....	99
<b>4 CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA .....</b>	<b>101</b>
STOSOWANE METODY BADAWCZE: .....	101
OPISY EKSPERYMENTÓW: .....	105
4.1 Otrzymywanie protoescygeniny (1) z 6-escyny .....	105
4.2 28-O-propargilprotoescygenina (6) .....	107
4.3 3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoprotoescygenina (2a) .....	108
4.4 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescygenina (3a) oraz 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-21-propargilprotoescygenina (3b) .....	110
4.5 Pochodne zawierające pierścień 1,2,3-triazolu .....	113
4.5.1 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescy-geniny z kwasem 4-azydobenzoesowym .....	113
4.5.2 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescy-geniny z 1-azydo-2,3,4,6-tetra- O-acetylo-β-D-glukopiranozą .....	114
4.5.3 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescy-geniny z 3-azydo-1-O- tertbutylodimetylosililo-4-O-benzylo-2,3,6-trideoksy-β-L-lykso-heksapiranozą .....	116
4.5.4 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilo-protoescy-geniny z 3-azydo-1-O- tertbutylodimetylosililo-2,3-dideoksy-β-D-arabinoheksopiranozą .....	117
4.5.5 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilo-protoescy-geniny z 1,6-anhydro-2-azydo- 2-deoksy-β-D-glukopiranozą .....	119
4.5.6 Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z kwasem 4-azydobenzoesowym .....	120
4.5.7 Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z 1-azydo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-gluko-piranozą ....	122
4.5.8 Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-4-O-benzylo-2,3,6- trideoksy-β-L-lykso-heksa-piranozą .....	124

4.5.9	Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-2,3-dideoksy-β-D-arabino-heksopiranozą .....	126
4.5.10	Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z 1,6-anhydro-2-azydo-2-deoksy-β-D-glukopiranozą.....	128
4.5.11	Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z 1-azydo-β-D-gluko-piranozą.....	129
4.5.12	Usuwanie zabezpieczeń z połączenia 28-propargilprotoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-4-O-benzylo-2,3,6-trideoksy-β-L-likso-heksapiranozą.....	131
4.5.13	Usuwanie zabezpieczeń z połączenia 28-propargilprotoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-2,3-dideoksy-β-D-arabino-heksopiranozą .....	133
4.5.14	Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescy-geniny z estrem dietylowym kwasu azydometylofosforowego .....	134
4.5.15	Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescy-geniny z estrem dietylowym kwasu azydoetylofosforowego .....	135
4.5.16	Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescy-geniny z estrem dietylowym kwasu azydopropylofosforowego .....	137
4.6	28-allilo-3,24;16,22-O,O-diizopropylideno- <i>protoescygenina</i> oraz 21-allilo-3,24;16,22-O,O-diizopropylideno- <i>protoescygenina</i> .....	138
4.7	3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-(trifenylometylo)- <i>protoescygenina</i> .....	139
4.8	28-(tert-butylodifenylsililo)-3,24;16,22-O,O-diizopropylideno- <i>protoescy-genina</i> .....	139
4.9	28-(tert-butylodimetylosililo)-3,24;16,22-O,O-diizopropylideno- <i>proto-escygenina</i> .....	140
4.10	28-benzylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygenina (9) .....	140
4.11	28-benzylo-16,22-O,O-izopropylidenoprotoscygenina (10) .....	142
4.12	24,28-dibenzylo-16,22-O,O-izopropylidenoprotoscygenina .....	143
4.13	24-allilo-28-benzylo-16,22-O,O-izopropylidenoprotoscygenina.....	143
4.14	28-benzylo-24-(triizopropylsililo)-16,22-O,O-izopropylideno- <i>protoescy-genina</i> (11).....	144
4.15	28-benzylo-24-(trifenylometylo)-16,22-O,O-izopropylideno- <i>protoescy-genina</i> (12).....	145
4.16	Glikozydowanie 28-benzylo-24-(triizopropylsililo)-16,22-O,O-izo-propylidenoprotoscygeniny .	146
4.17	Reakcja propargilowania 28-benzylo-24-(trifenylometylo)-16,22-O,O-izopropylideno- <i>protoescygeniny</i> .....	146
4.18	24,28-O-bis-(tert-butylodifenylsililo)- <i>protoescygenina</i> (13).....	147
4.19	24,28-O-bis-(triizopropylsililo)- <i>protoescygenina</i> (14) .....	149
4.20	24,28-O-bis-(tert-butylodifenylsililo)-21,22-O,O-izopropylidenoprotoscygenina (15) .....	151
4.21	24,28-O-bis-(triizopropylsililo)-21,22-O,O-izopropylideno- <i>protoescy-genina</i> (16).....	152
4.22	24,28-bis-(tert-butylodifenylsililo)-3-propargilo-21,22-O,O-izopropylidenoprotoscygenina ....	153
4.23	3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-metylosulfonyloprotoscygenina .....	153
4.24	3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-paratoluenosulfonyloprotoscy-genina.....	154
4.25	28-halogeno-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygenina .....	154
4.26	28-azydo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygenina.....	155
4.27	Reakcje utlenienia 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny.....	156

4.27.1 17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygenina .....	156
4.27.2 21-okso-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygenina (17).....	157
4.27.3 Inne metody utleniania .....	158
4.28 Reduktywne aminowanie 17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny .....	159
4.29 Reakcja Wittiga 17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-protoscygeniny z amidem sodowym bromku izopropylfenylofosfoniowego.....	159
4.30 Reakcja 17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny z semikarbazydem .....	159
4.31 Eter 2-chloroetoksyetylowy 3,24;16,22-O,O-diisopropylideno-protoscygeniny .....	160
4.32 Reakcja Mitsunobu 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny .....	160
4.33 28-(etyloftalimido)-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygenina .....	161
4.34 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-(propyloftalimido)-protoscygenina.....	161
4.35 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-O-(metoksykarbonylometylo)-pro-otoscygenina.....	161
4.36 Próby otrzymania scygeniny z protoscygeniny.....	162
4.37 Badania polimorfizmu protoscygeniny:.....	163
4.37.1 Metoda z jednego rozpuszczalnika .....	163
4.37.2 Metoda z dwóch rozpuszczalników .....	163
4.37.3 Wytworzenie monokryształów metodą dyfuzyjną .....	164
4.37.4 Przemiana fazowa pod wpływem wysokiej temperatury .....	164
4.38 Badania polimorfizmu 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny: .....	164
4.38.1 Otrzymywanie 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny (2a) do badań formy krystalicznej	164
4.38.2 Oczyszczanie 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny .....	165
4.38.3 Otrzymywanie monokryształu 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-protoscygeniny.....	166
<b>5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW ORAZ WNIOSKI .....</b>	<b>167</b>
<b>6 STOSOWANE SKRÓTY .....</b>	<b>169</b>
<b>7 WYKAZ RYCIN .....</b>	<b>171</b>
<b>8 WYKAZ SCHEMATÓW .....</b>	<b>173</b>
<b>9 WYKAZ TABEL .....</b>	<b>175</b>
<b>10 LITERATURA .....</b>	<b>176</b>

## 1 Wstęp

Escyna jest mieszaniną saponin pozyskiwaną z kasztanowca (rośliny rodziny *Aesculus*). Wykorzystuje się ją w tradycyjnych lekach i preparatach działających przeciwzapalnie, łagodzących ból czy zmniejszających obrzęki. Wiedza o takim działaniu pochodzi z etnofarmakologicznej tradycji leczniczej, a więc głównie z doświadczenia i obserwacji poprzedzających wprowadzenie naukowych metod badania surowców roślinnych. Obecnie jednak nadal niewiele wiadomo na temat chemicznej i farmakologicznej charakterystyki produktów fitochemicznych obecnych na rynku farmaceutycznym. Rozwój nauk chemicznych, farmaceutycznych i medycyny umożliwił coraz skuteczniejsze badanie substancji aktywnych takich jak escyna. Stawiano hipotezy dotyczące mechanizmu jej działania, próbowano odpowiedzieć na pytanie który składnik jest kluczowy dla jej aktywności biologicznej.

Weryfikacja hipotez, zgodnie z wymaganiami współczesnej farmakologii molekularnej, wymagałaby szczegółowych badań prowadzonych osobno na każdym ze składników mieszaniny określanych zbiorczo mianem escyny. Obecny stan technik separacyjnych nadal nie rokuje możliwości opracowania procesu rozdziału natywnych składników mieszaniny saponin kasztanowca, poza poziomem analitycznym i ewentualnie preparatywnym HPLC.

Jednakże możliwe jest przyjęcie odmiennej koncepcji, w której zainteresowanie eksperymentatora skupia się na głównym aglikonie saponin kasztanowca – protoescygeninie. Przyjęty sposób pozyskiwania nowych struktur polega na kontrolowanej degradacji hydrolitycznej wyjściowej mieszaniny escyny, co zasadniczo upraszcza skład chemiczny, a następnie wykorzystaniu jej głównego składnika trójterpenowego jako prekursora zbioru nowych pochodnych wytwarzanych metodami syntezy chemicznej. Podejście takie zapewnia możliwość wymaganej kontroli jakości surowców i półproduktów a w szczególności substancji przeznaczonych do badań aktywności biologicznej, co jest niezbędnym warunkiem uznania prawidłowości wyników badań w świetle prawa farmaceutycznego i aktualnych rozporządzeń wykonawczych.

Ze względu na wspomniane powyżej argumenty dotyczące wagi oraz użyteczności preparatów/substancji aktywnych opartych na escynie, a w szczególności na jej



potencjalnych syntetycznych mimetykach, w 2010 roku rozpoczęto w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie we współpracy z Warszawskim Uniwersytetem Medycznym realizację projektu pt.: „Poszukiwanie innowacyjnego leku śródbłonkowego w grupie nowych pochodnych escyny”. Projekt zakładał prace jednocześnie na trzech płaszczyznach:

- ✓ Chemicznej – pozyskanie z surowca naturalnego substratu do syntezy (protoescygenina) oraz jego wykorzystanie do otrzymania puli pochodnych o potencjalnym znaczeniu farmaceutycznym.
- ✓ Biologicznej – porównanie aktywności biologicznej otrzymanych pochodnych do aktywności substancji wzorcowych (testy *in vitro*).
- ✓ Medycznej - poznanie mechanizmu niewydolności żyłnej oraz sposobu działania stosowanych terapeutycznie preparatów escynowych (eksperymenty modelowe z wykorzystaniem szczurów).

Realizowana w Instytucie Farmaceutycznym chemiczna część projektu stała się podstawą i inspiracją do opracowania indywidualnych doświadczeń oraz wyników syntetycznych uzyskanych podczas jej trwania jak również w późniejszym czasie, w postaci Tezy niniejszej pracy.

## 2 Cel pracy

Celem zaprezentowanych badań była weryfikacja możliwości selektywnego modyfikowania skomplikowanych układów polihydroksylowych w typowym układzie pentacyklicznego trójterpenu –  $\beta$ -amyryny.

Prowadzone doświadczenia dotyczyły w szczególności:

- ✓ pozyskania z surowca naturalnego konkretnej sapogeniny - ściśle scharakteryzowanego polihydroksylowego substratu jako bazy do dalszych doświadczeń, w sposób umożliwiający opracowanie odpowiedniego procesu technologicznego,
- ✓ weryfikacji użyteczności najpopularniejszych metod zabezpieczenia grup hydroksylowych w wieloetapowych syntezach organicznych,
- ✓ transformacji/wprowadzenia nowych grup funkcyjnych w określone miejsca w cząsteczce.

Postulatem dodatkowym, sformułowanym już w trakcie realizacji założeń wstępnych, było wykorzystanie zdobytej wiedzy do uzyskania pochodnej możliwie wiernie naśladującej pod względem strukturalnym naturalnie występujące saponiny. Otrzymanie takiego mimetyku w dużym uproszczeniu zakłada podstawienie grup hydroksylowych w położeniach C3 (miejsce kluczowe, w którym w przypadku monodesmozydów do sapogeniny podłączona jest część cukrowa – tworząc saponinę) oraz C21 i/lub C22, a główna trudność zadania polega właśnie na przeprowadzeniu przemian pozwalających w kontrolowany sposób sterować selektywnością podstawiania grup hydroksylowych.

Podstawowym założeniem przy planowaniu badań było wykorzystanie trójterpenowego aglikonu – protoescygeniny (olean-12-eno-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,21 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,24,28-heksaol), otrzymanego po dwustopniowej hydrolizie dostępnej handlowo  $\beta$ -escyny, który następnie poddawano transformacjom prowadzącym do pochodnych o wyższym stopniu podstawienia. Zabezpieczone w korzystny sposób pochodne poddawano kolejnym przemianom, w ten sposób powstała między innymi seria pochodnych będących połączeniem trójterpenu sfunkcjonalizowanego eterem propargilowym (wiązanie potrójne) z azydkami (głównie zabezpieczonymi azydocukrami). Stworzenie takiej serii

pozwoili zweryfikowa metody selektywnego zdejmowania grup zabezpieczajcych o odmiennej naturze chemicznej w czsteczkach o bardziej zonej strukturze, bo skadajcych si z czci cukrowej i aglikonu.

Równolegle podjto próby modyfikacji grupy hydroksylowej w ugrupowanie o innym charakterze chemicznym. W sposób bezpoedni (wymiana jednej grupy na inn) lub poedni (poprzez łącznik) próbowano selektywnie wprowadzi do struktury protoescygeniny grup aminow, karbonylow, azydkow oraz halogenek. Przekształcenia takie pełni dwojak funkcję. Z jednej strony otwieraj dostp do nowych typów reakcji a te prowadz do dalszych pochodnych, z drugiej zmiana natury grupy moe działać jak forma zabezpieczenia – wyłączajc daną pozycję z możliwości konkretnego podstawienia.

Przyjty kierunek prowadzonych prac po lekturze dostpnej literatury mogłby wydawać si prosty w realizacji. Opublikowano dotychczas pokonną liczb artykułów traktujcych o chemii genin trójterpenowych. Jednakże zdecydowana wikszość zaprezentowanych w nich zaawansowanych metod modyfikacji natywnych terpenowych sapogenin dotyczy kwasów (między innymi oleanolowego czy betulinowego) czyli obiektów molekularnych, w których ilość grup funkcyjnych jest relatywnie mała (zazwyczaj trzy – grupa karboksylowa, hydroksylowa oraz wiązanie podwójne), za to ich zróżnicowanie bardzo wyraźne, co ułatwia selektywne, sekwencyjne przeprowadzenie zaplanowanych transformacji. Właśnie dlatego opisane w niniejszej pracy próby selektywnych przemian na tak skomplikowanym, polihydroksylowym trójterpenie jakim jest protoescygenina, stanowi przykład bezprecedensowy a zebrane przy tej okazji doświadczenie moe być bardzo przydatne w dalszych badaniach nad związkami naturalnymi o podobnej strukturze.

## 2 Część literaturowa

Przystępując do badań nad indywiduami chemicznymi pochodzenia naturalnego niezbędnym wydaje się zapoznanie z zagadnieniami, które zebrane razem dałyby badaczowi szerokie spojrzenie na projekt, który przyszło mu realizować. Dlatego w Części literaturowej niniejszej pracy, w pięciu podrozdziałach zaprezentowano wiedzę chemiczną będącą koniecznym wstępem oraz wsparciem w trakcie prowadzonych badań nad selektywnymi transformacjami niezwykle wymagającej pod względem syntetycznym heksahydroksylowej sapogeniny – protoescygeniny – pochodzącej z mieszaniny naturalnych saponin roślin z rodziny *Aesculus*.

Podrozdział 2.1 stanowi wprowadzenie do chemii terpenów, w szczególności trójterpenów i ich pochodnych, w dużym skrócie opisujący proces powstawania tych związków w organizmach żywych a także etapy odkrywania i poznawania ich struktury oraz właściwości (w tym terapeutycznych) przez człowieka.

W podrozdziale 2.2 zaprezentowano przebieg kilkuletnich badań nad saponiną OSW-1 pozyskiwaną z roślin rodziny *Ornithogalum*. Mimo, że różni się ona wyraźnie strukturą od  $\beta$ -escyny, to stanowi idealny oraz warty naśladowania przykład właściwie poprowadzonej ścieżki badawczej wiodącej od znalezienia potencjalnie użytecznego związku w przyrodzie, przez pełną jego charakterystykę fizykochemiczną oraz możliwości syntetyczne, aż do badań biologicznych i zastosowania w farmakologii.

W podrozdziale 2.3 zawarto najważniejsze informacje na temat escyny jako mieszaniny saponin, opis struktury jej głównych składników a także wspomniano o badaczach, którzy jako pierwsi ją wyizolowali i scharakteryzowali. Istotnym elementem tego podrozdziału jest przegląd biologicznych i farmakologicznych aktywności escyny, który umożliwia dostrzeżenie pewnych relacji między strukturą a aktywnością (SAR) saponin trójterpenowych (a pośrednio także ich aglikonów).

Podrozdziały 2.4 oraz 2.5 zawierają kolejno dyskusję dotyczącą reaktywności grup hydroksylowych w najpowszechniej spotykanych cyklicznych układach polihydroksylowych oraz zbiór podstawowych informacji na temat metodologii grup zabezpieczających a w szczególności tych wykorzystywanych właśnie do zabezpieczenia grup hydroksylowych.

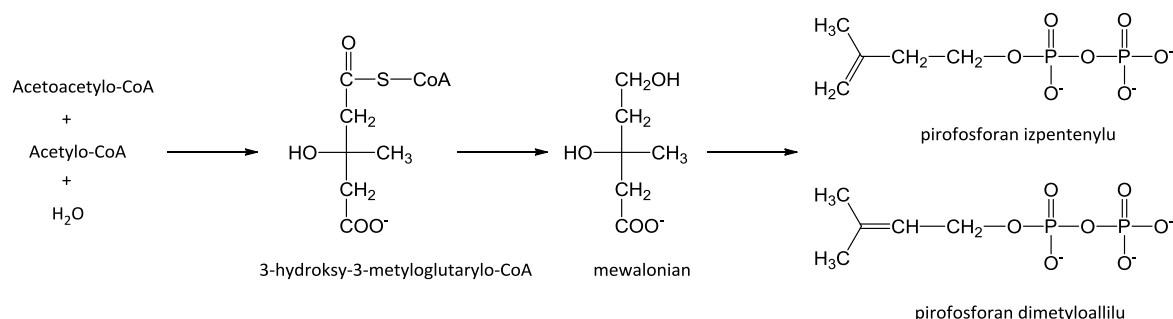
## 2.1 Trójterpeny – pochodzenie i rola

Związki organiczne pochodzenia naturalnego (metabolity wtórne roślin i mikroorganizmów) stanowią bogate źródło substancji towarzyszących od zarania rozwojowi cywilizacyjnemu ludzkości. Z punktu widzenia współczesnej nauki, szczególnie dyscyplin określanych jako nauki przyrodnicze o podstawach molekularnych, zasoby te najchętniej rozpoznajemy, badamy i klasyfikujemy z punktu widzenia różnorodności strukturalnej. Nie należy zapominać o ustaleniu powiązań między budową tych związków a ich właściwościami i możliwymi zastosowaniami. W tym kontekście szczególnie interesujące wydaje się twierdzenie współczesnych nauk o życiu, które głoszą, że ok. 60% aktualnie stosowanych w medycynie substancji leczniczych pochodzi od substancji naturalnych, pierwotnie pozyskanych ze źródeł biologicznych. Terpeny stanowiące podzbiór w klasie metabolitów o wspólnym pochodzeniu określanym także jako izoprenoidy, to szczególnie liczna grupa związków naturalnych, których znaczenie dla wytwarzających je organizmów jest często jeszcze przedmiotem dociekań i debat. Wiadomo jednak, że odgrywają ważne role w środowisku przyrodniczym, wykazując wielokierunkową aktywność biologiczną wobec innych układów niż organizm wytwarzający dany metabolit. Dlatego też temat niniejszej rozprawy wymaga nieco bliższego omówienia zarówno pochodzenia wskazanej różnorodności chemicznej jak i konsekwencji tego zjawiska dla oblicza współczesnych nauk przyrodniczych i medycznych.

Człowiek stykał się w swym rozwoju cywilizacyjnym z substancjami terpenowymi, takimi jak żywice roślinne, kałafonia, terpentyna czy olejki aromatyczne od czasów prehistorycznych, wykorzystując między innymi ich właściwości przeciw-patogenne i konserwujące. Materiały te były też źródłem pierwszej generacji czystych substancji pochodzenia roślinnego, jakie pojawiły się w okresie rozwoju nowożytnego aptekarstwa (XIX wiek) równolegle z alkaloidami i kwasami organicznymi. Przerób żywic pozwalał na wyodrębnienie indywidualnych niskocząsteczkowych terpenów o charakterystycznej modułowej strukturze złożonej z jednostek pięciowęglowych. Niemiecki chemik Otto Wallach<sup>1</sup> jako pierwszy zwrócił uwagę na regularność budowy znanych wówczas związków terpenowych i wskazał, że zawierają one różnorodne połączenia reszt izopentenowych (izoprenowych) a więc krotność rozgałęzionych segmentów

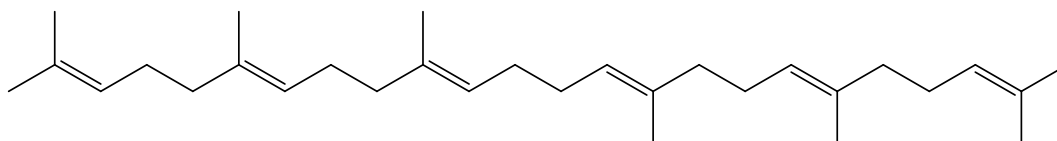
pięciowęglowych (C<sub>5</sub>), co jak stwierdzono później prowadzi do kategorii strukturalnych określonych jako: mono- , seskwi- , di- , tri- oraz tetra- terpeny. Radykalne rozwinięcie tej hipotezy strukturalnej na wszystkie produkty terpenoidowe wywodzące się ze wspólnego pnia genetycznego, znane dziś jako „biogenetyczna reguła izoprenowa” (BRI), zawdzięczamy Leopoldowi Ruziczce i grupie jego współpracowników i uczniów z ETH w Zurychu.<sup>2</sup> Ruzicka stał się liderem badań nad izoprenoidami w tym ośrodku a działalność stworzonej przez niego szkoły badań tej grupy związków naturalnych trwała przez ponad pół wieku, przynosząc setki publikacji na temat ich relacji strukturalnych i reaktywności chemicznej. W pięćdziesięciolecie ogłoszenia pracy publikującej zasadnicze założenia i sformułowania BRI<sup>3</sup>, żyjący współautorzy tego artykułu (Albert Eschenmoser i Duilio Arigoni) opublikowali jego anglojęzyczne tłumaczenie ze współczesnymi komentarzami, potwierdzając prymat wizji i refleksji intelektualnej nad prostym sumowaniem kolejnych faktów.<sup>4</sup>

Liczbę znanych produktów naturalnych o budowie izoprenowej ocenia się obecnie na 20 do ponad 40 tysięcy, znane są główne szlaki transformacji biogenetycznych i budowa enzymów odpowiedzialnych za ich realizację.<sup>5</sup> W krótkim omówieniu zmierzającym do wyjaśnienia tej ogromnej różnorodności strukturalnej izoprenoidów należałoby się skoncentrować z oczywistych względów tylko na etapach istotnych dla biogenezy trójterpenów. Aktywne syntony izoprenowe: izopentenylowy (IPP) oraz dimetyloallilowy (DMAPP), w postaci pirofosforanów pochodzą z dekarboksylacyjnej fragmentacji kwasu mewalonowego, który z kolei powstaje z acetoacetylu koenzymu A oraz acetylo koenzymu A (Schemat 1).



**Schemat 1.** Powstawanie syntonów izoprenowych.

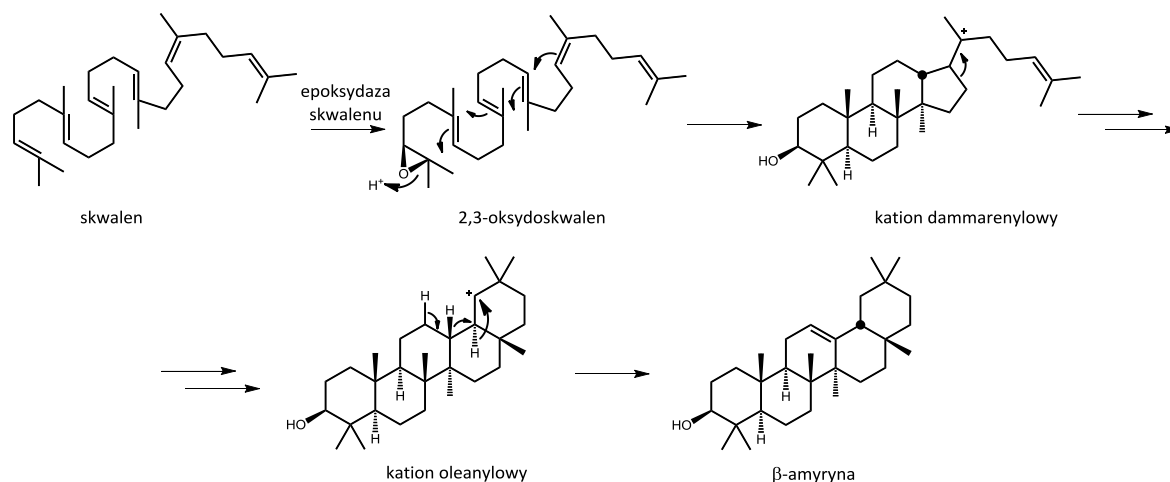
Łączenie jednostek izoprenowych z utworzeniem nowych wiązań węgiel – węgiel polega na reakcji nukleofilowych wiązań podwójnych z alilowymi lub homoalilowymi fosforanami, które stanowią dobre grupy opuszczające i prekursory odpowiednich karbokationów. W wyniku reakcji dwóch jednostek izoprenowych powstaje karbokationowy produkt  $C_{10}$  (równoważnik monoterpenów) z jednym wiązaniem podwójnym, podatny na dalsze przemiany chemiczne, które choć zachodzą w miejscu aktywnym enzymu i mają charakter reakcji stereospecyficznych zarówno wobec istniejących już centrów chiralności jak i wobec obecnych w cząsteczce ugrupowań prochiralnych, są generalnie zgodne z tendencją dążenia przejściowej struktury karbokationowej do minimalizacji energii. Termodynamiczna stabilizacja karbokationów wynikających z łączenia fosforanów izoprenoli w najprostszym przypadku polega na odłączeniu protonu z wytworzeniem wiązania podwójnego lub przyłączeniu nukleofilowego anionu (na przykład z utworzeniem odpowiedniego alkoholu). Inne możliwości etapowej stabilizacji pierwotnego karbokationu to wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja z udziałem podwójnego wiązania lub 1,2- migracje: jonu wodorkowego lub grupy alkilowej, co zwykle skutkuje zmianami szkieletowymi struktury izoprenoidu. Wspólnymi półproduktami syntezy trójterpenów i steroli są - pirofosforan farnezyli ( $C_{15}$ ; FPP) oraz jego „dimer” – nienasycony węglowodór skwalen (SQ; Rys. 1.), powstający w wyniku połączenia przez odpowiednie enzymy dwóch syntonów piętnastowęglowych (FPP) w układzie „głowa do głowy”.



**Rys. 1.** Struktura skwalenu (SQ).

Cyklizacja skwalenu jako proces o uniwersalnym znaczeniu dla wytwarzania steroli i trójterpenów roślinnych oraz sterydów zwierzęcych zasługuje na szczególną uwagę. Cyklazy skwalenu i syntazy trójterpenowe są liczną grupą enzymów z wyraźnie zaznaczoną specyficznością substratową – cyklizują sam skwalen lub jego 2,3-epoksydową pochodną (OSQ), a w wyniku kolejnych przemian enzymatycznych 2,3-oksydoskwalenu prowadzą między innymi do cykloartenolu, lanosterolu czy też  $\beta$ -amyryny (Schemat 2.). Krytyczna dla

metabolizmu zwierzęcego transformacja lanosterolu do cholesterolu wymaga kolejnych 19 etapów biosyntezy.



**Schemat 2.** Enzymatyczne przekształcenia skwalenu do trójterpenu –  $\beta$ -amyriny.

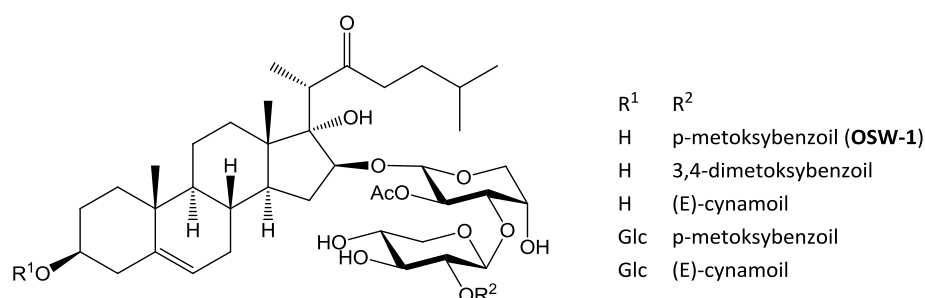
Stosunkowo niedawno stwierdzono, że genom modelowej rośliny doświadczalnej – rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), która nie jest rośliną „terpenogenną”, koduje 13 cyklaz oksydoskwalenowych, w tym znane z innych roślin (i z badań strukturalnych metodami dyfrakcji rentgenowskiej): syntazę lanosterolu (LSS), syntazę skwalenowo-hopenową (SHC) oraz syntazę cykloartenolu (CAS1).<sup>6</sup> Dokładniejsze badania ujawniły jednak dodatkowo obecność syntazy baruolu (BARS1), która oprócz tego tetracyklicznego trójterpenowego alkoholu produkuje jeszcze 22 inne związki izoprenoidowe w małych ilościach, co dobrze ilustruje potencjał różnorodności strukturalnej generowanej z jednej tylko cyklazy. Przemiany skwalenu i pierwotnych produktów jego katalizowanych enzymatycznie cyklizacji są obecnie przedmiotem szerokich studiów mechanistycznych prowadzonych metodami chemii teoretycznej i obliczeń kwantowo-mechanicznych. Pozwala to na rozszerzenie dyskusji o poszczególnych etapach biotransformacji terpenoidów o elementy kalkulacji termodynamicznych, co z kolei ma znaczenie dla projektowania przyszłych procesów chemicznych i biotechnologicznych.<sup>7</sup> Należy też pamiętać, że produkty cyklaz i syntaz terpenowych są z kolei substratami enzymów utleniających z grupy cytochromów P-450, co prowadzi do regio- i stereospecyficznych hydroksylacji w poszczególnych pierścieniach. Wreszcie hydroksylowane pochodne węglowodorów trójterpenowych na różnym stopniu utlenienia stają się substratami dla



innych grup enzymów, w szczególności przenoszących reszty acylowe i glikozydowe (acylazy i glikozylotransferazy). Glikozydowe pochodne trójterpenów, zaliczane do saponin i często traktowane jako osobna kategoria związków naturalnych, mają osobną pulę literatury traktującej o ich aktywności biologicznej, co ma uzasadnienie historyczne związane z ich wcześniej rozpoznanymi właściwościami hemolitycznymi i biobójczymi. Współczesne badania biochemiczne i farmakologiczne wskazują bezspornie, że trójterpeny są związkami wykazującymi wielokierunkową aktywność biologiczną na różnych poziomach strukturalnych – jako wielofunkcyjne, częściowo acylowane saponiny, jako natywne sapogeniny, ale także jako syntetycznie modyfikowane pochodne naturalnych metabolitów wtórnych.

## 2.2 Kompleksowe badania nad saponiną OSW-1 jako wzór do naśladowania

Do roślin z rodzaju *Ornithogalum* L. i należących do rodziny hiacyntowatych (Hyacinthaceae) zalicza się obecnie około 200 gatunków pochodzących głównie z terenów Afryki, Europy oraz Azji. Wiele z nich (m.in. *Ornithogalum caudatum*) znanych jest w tradycyjnej medycynie chińskiej z właściwości przeciwnowotworowych, przeciwbakteryjnych, przeciwwirusowych oraz przeciwzapalnych<sup>8</sup>, z kolei inne znane są ze swej silnej toksyczności.<sup>9</sup> W roku 1992 Sashida i współpracownicy<sup>10</sup> przeprowadzili szczegółowy fitochemiczny przegląd związków naturalnych obecnych w ekstraktach z nasion *Ornithogalum saundersiae*, wyizolowując w ten sposób między innymi glikozydy cholestanów – w tym główny składnik ekstraktów, czyli saponinę nazwaną później OSW-1 (Rys. 2.) – wykazujące ponadprzeciętną aktywność biologiczną.



**Rys. 2.** Struktura OSW-1 oraz jej analogów – saponiny z roślin rodzaju *Ornithogalum*.

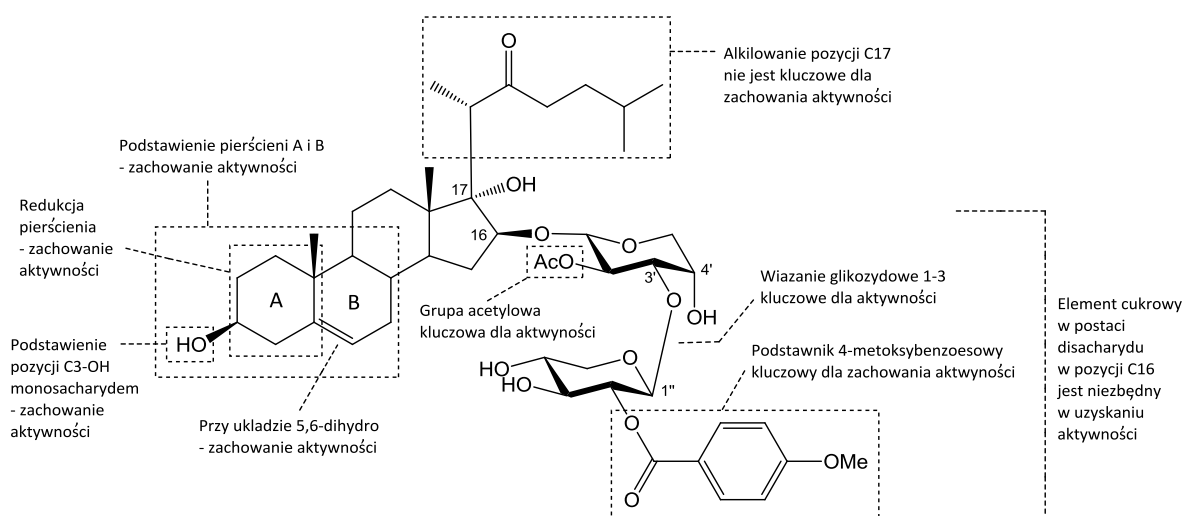
Trzy lata później, w roku 1995, przedstawiono wyniki bardziej szczegółowych badań biologicznych, które wykazały wyjątkową aktywność cytostatyczną saponin OSW przeciwko różnym rodzajom komórek nowotworowych.<sup>11</sup> Taki stan rzeczy zainspirował do rozpoczęcia intensywnych badań nad udoskonaleniem procesu izolacji oraz syntezy glikozydów steroidowych OSW i ich analogów.

Studiowanie aktywności biologicznej saponin z roślin rodzaju *Ornithogalum* rozpoczęto przed rokiem 2000, zaledwie kilka lat po pierwszych doniesieniach i wzmiankach literaturowych, które stanowiły prace Y. Sashidy, o których wspomniano wcześniej. Pięć glikozydów steroidowych wyizolowanych z metanolowego ekstraktu nasion *O. saundersiae* charakteryzowało się silnym hamowaniem nowotworu szpiku (komórki białaczki HL-60).<sup>12</sup> Co najważniejsze w badaniach klinicznych aktywność ta wydawała się silniejsza od ówczesnych substancji referencyjnych takich jak etopozyd, adriamycyna lub metotreksat. Spośród otrzymanych saponin OSW szczególną uwagę zwrócono na jedną dającą najlepiej rokujące wyniki, którą nazwano OSW-1 i dalsze badania skupiły się wokół tego związku. Aktywność przeciw komórkom nowotworów płuc i piersi okazała się od 10 do 100 razy wyższa od takich leków jak mitomycyna C (MMC), ADM, *cis*-platyna (CDDP), CPT czy paklitaksel. Ponadto saponina OSW-1 charakteryzowała się bardzo niską toksycznością dla zdrowych komórek, a dawki ustalone jako lecznicze nie powodują występowania wielu skutków ubocznych spotykanych w kuracjach innymi popularnymi cytostatykami.

Kiedy już znaleziono związek wykazujący interesującą aktywność zaczęto zastanawiać się, jakie elementy cząsteczki wpływają na jej takie a nie inne właściwości biologiczne. Wykonanie analizy relacji między strukturą a aktywnością (Structure–Activity Relationship; SAR), zwłaszcza w tak skomplikowanych związkach jak saponiny, nie jest proste, jednak uzyskane informacje warte są poniesionego trudu. Wiedza o tym, które elementy cząsteczki mogą być kluczowe dla zachowania właściwości biologicznych, a jakie można modyfikować bez konsekwencji, jest niezbędna by „udoskonaląć naturę” przez planowanie i syntezę pochodnych, które mają szansę spełnić przyjęte przez eksperymentatora założenia. Do wykonania analizy SAR konieczne jest wyizolowanie możliwie licznej grupy analogów a także otrzymanie pochodnych modyfikowanych w różny

sposób i w wielu miejscach, a następnie przebadanie uzyskanych serii pod kątem działania biologicznego. Dopiero dysponując rozległą biblioteką scharakteryzowanych związków możliwe jest wyciągnięcie właściwych wniosków i świadome planowanie syntezy kolejnych pochodnych.

Kilka lat intensywnych prac nad saponinami OSW (w szczególności OSW-1) i ich modyfikowanymi pochodnymi pozwoliło na ustalenie pewnych zależności między strukturą a aktywnością tych potencjalnie użytecznych związków (Rys. 3.).

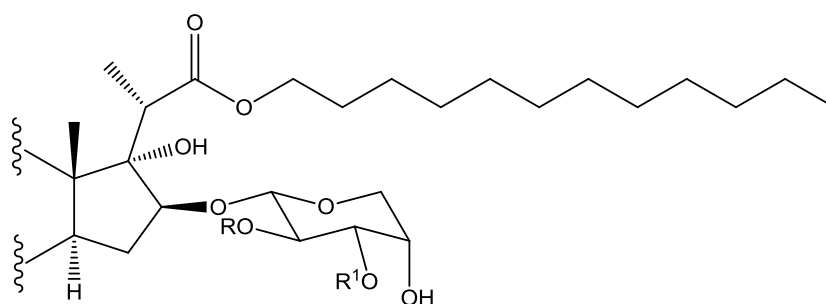


**Rys. 3.** Wynik analizy SAR dla saponiny OSW-1 w kontekście aktywności przeciwnowotworowej.<sup>12</sup>

Ustalono między innymi, że obecność elementu 16-O-disacharydowego jest niezbędna dla zachowania właściwości przeciwnowotworowych. Nie samo wiązanie ale także jego konfiguracja okazuje się mieć znaczenie, po inwersji konfiguracji związek tracił swoją wyjątkowo wysoką aktywność.<sup>13</sup> Ponadto obecne w części cukrowej podstawniki, takie jak acetyl oraz grupa 4-metoksybenzoesowa, wpływają na toksyczność cząsteczki. Ich brak w strukturze powodował wzrost cytotoksyczności aż o trzy rzędy wielkości.<sup>11,14,15</sup> Połączenie między L-arabinopiranozą a D-ksylopiranozą również odgrywa niemałą rolę w podtrzymaniu aktywności biologicznej, ponieważ zmiana wiązania w dwucukrze z 1→3 glikozydowego na 1→4 powoduje jej drastyczny spadek przy jednoczesnym wzroście toksyczności. Z drugiej strony w cząsteczce obecne są elementy, które można modyfikować w mniejszym lub większym stopniu – takie jak łańcuch alkilowy w pozycji C17 oraz pierścienie A i B aglikonu, w obrębie których zmiany nie obniżają potencjału

OSW-1 (odpowiednie modyfikacje mogłyby go nawet zwiększyć). Podobnie pochodne 5,6-dihydro (usunięcie podwójnego wiązania) oraz podstawione monosacharydem w pozycji C3-OH, zachowują właściwości związku wyjściowego.<sup>11,14,15</sup>

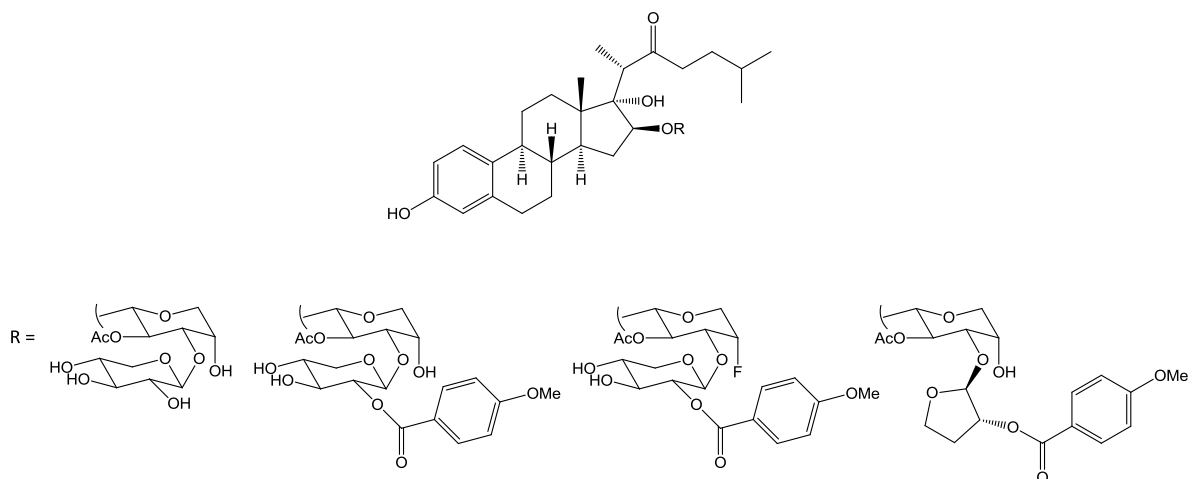
Bazując na analizach SAR dostępnych w literaturze jak również na własnych doświadczeniach, wiele grup badawczych w ostatnich latach podjęło się modyfikowania związku OSW-1 (jak również innych saponin OSW).<sup>16,17</sup> Elementami najczęściej poddawany zmianom był łańcuch alifatyczny w pozycji C17 oraz podstawnik cukrowy. Tang i współpracownicy zdecydowali się modyfikować łańcuch C17 oraz część sacharydową tak, by uprościć jego strukturę (Rys. 4).<sup>18</sup> Początkowo udowodnili, że zmiana struktury łańcucha na estrową zwiększa aktywność przeciwko niektórym liniom komórek nowotworowych.<sup>17,19</sup> Rezygnacja z drugiego monosacharydu i zastąpienie go prostszymi podstawnikami doprowadziło do spadku aktywności w testach na liniach komórek rakowych, tym samym potwierdzając rolę struktury disacharydowej w tej części cząsteczki. Równolegle inne modyfikacje w obrębie sacharydu wprowadzał Tschamber i współpracownicy, wykorzystując jako substrat analog OSW-1 z aromatycznym pierścieniem A (Rys. 5).<sup>20</sup> Potwierdzili oni konieczną obecność acetylu oraz p-metoksybenzoilu, ponadto wskazali na znaczenie grupy C4'-OH, która zamieniona na atom fluoru lub usunięta całkowicie powodowała spadek aktywności biologicznej.



R = Ac lub MBn

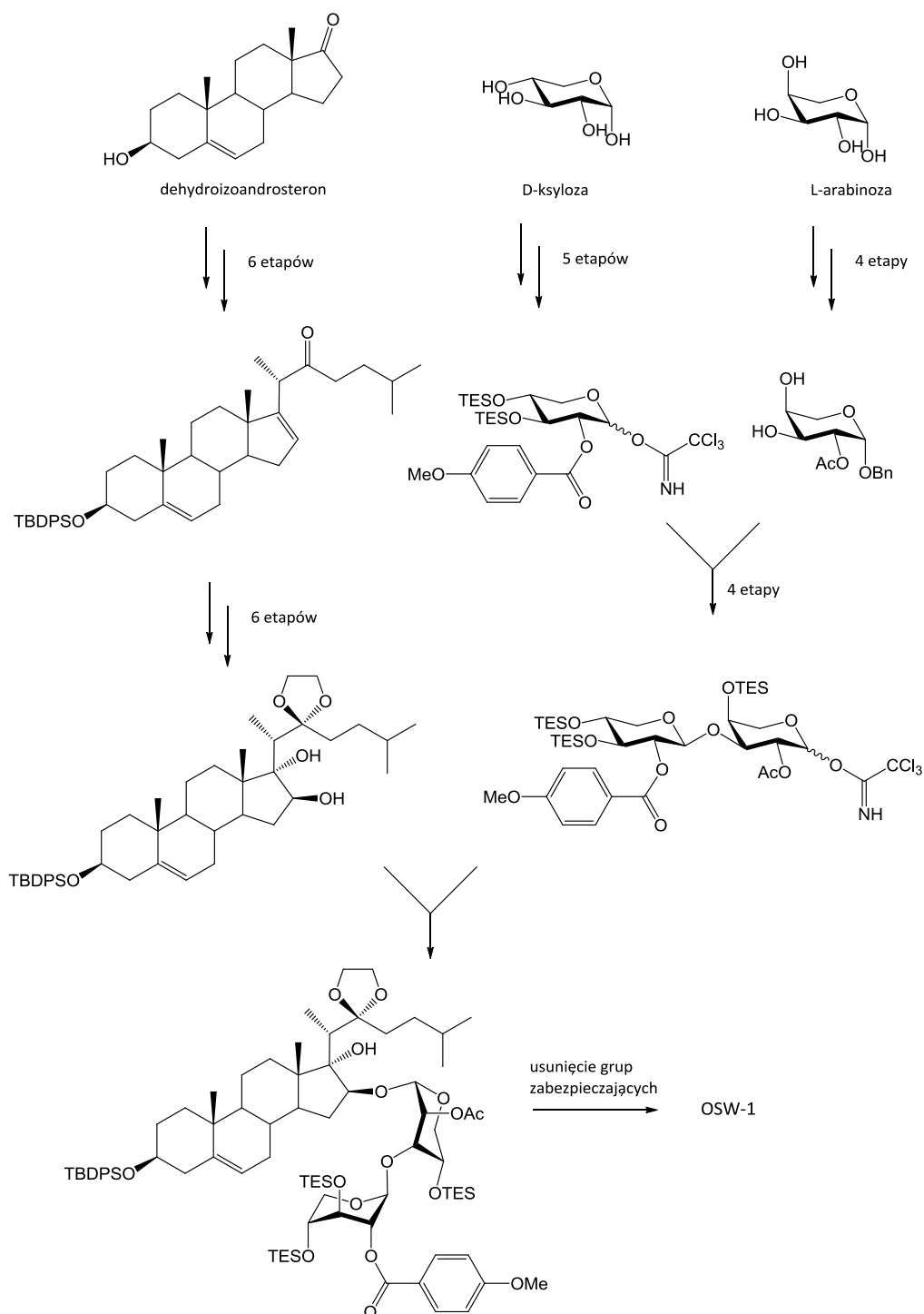
R<sup>1</sup> = H ; All ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OMBn ; -CH<sub>2</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>OMBn lub -CH<sub>2</sub>CH=CHC(=O)OEt

**Rys. 4.** Struktura modyfikowanych elementów cukrowych oraz łańcucha w pozycji C17.<sup>18</sup>



**Rys. 5.** Modyfikacje części cukrowej analogu OSW-1.<sup>20</sup>

Równolegle do prac nad modyfikacjami OSW-1 rozpoczęto próby syntezy tej saponiny z możliwie najprostszych syntonów organicznych. Syntezy totalne tego typu są istotne głównie ze względu na możliwość ich skalowania. Ponieważ izolowanie związków ze źródeł naturalnych jest często kłopotliwe lub bardzo mało wydajne, rozsądnym wydaje się podjęcie prób otrzymania związku naturalnego metodami syntetycznymi. Pierwszą totalną syntezę zaproponował w roku 1999 Deng i współpracownicy, którzy w wyniku 27-etapowej syntezy otrzymali OSW-1 z wydajnością całkowitą rzędu 6% (Schemat 3.).<sup>21</sup> Podzielili oni saponinę na dwie części – aglikon oraz disacharyd, z których obie otrzymano równolegle by w końcowych etapach połączyć je i móc usunąć wszystkie zbędne już grupy zabezpieczające. Punktem wyjścia do otrzymania aglikonu był dostępny handlowo dehydroizoandrosteron, natomiast element disacharydowy zsyntezowano łącząc odpowiednio zabezpieczone cukry - L-arabinozę oraz D-ksylozę.



**Schemat 3.** Uproszczony schemat syntezy totalnej saponiny OSW-1 z 1999 roku.<sup>21</sup>

W następnych latach pojawiał się szereg artykułów podejmujących tematykę poszukiwania alternatywnych szlaków syntezy tej coraz ważniejszej pod względem farmaceutycznym saponiny. Przeważająca większość nowych szlaków syntezy opiera się w większym lub mniejszym stopniu na tym, który zaprezentował Deng w 1999 roku. Wprowadzane zmiany

mają na celu podniesienie wydajności wieloetapowego procesu, na przykład przez ograniczenie ilości etapów, zmianę odczynników użytych w reakcjach lub wybór innych, bardziej złożonych ale nadal dostępnych komercyjnie substratów.<sup>22,23</sup>

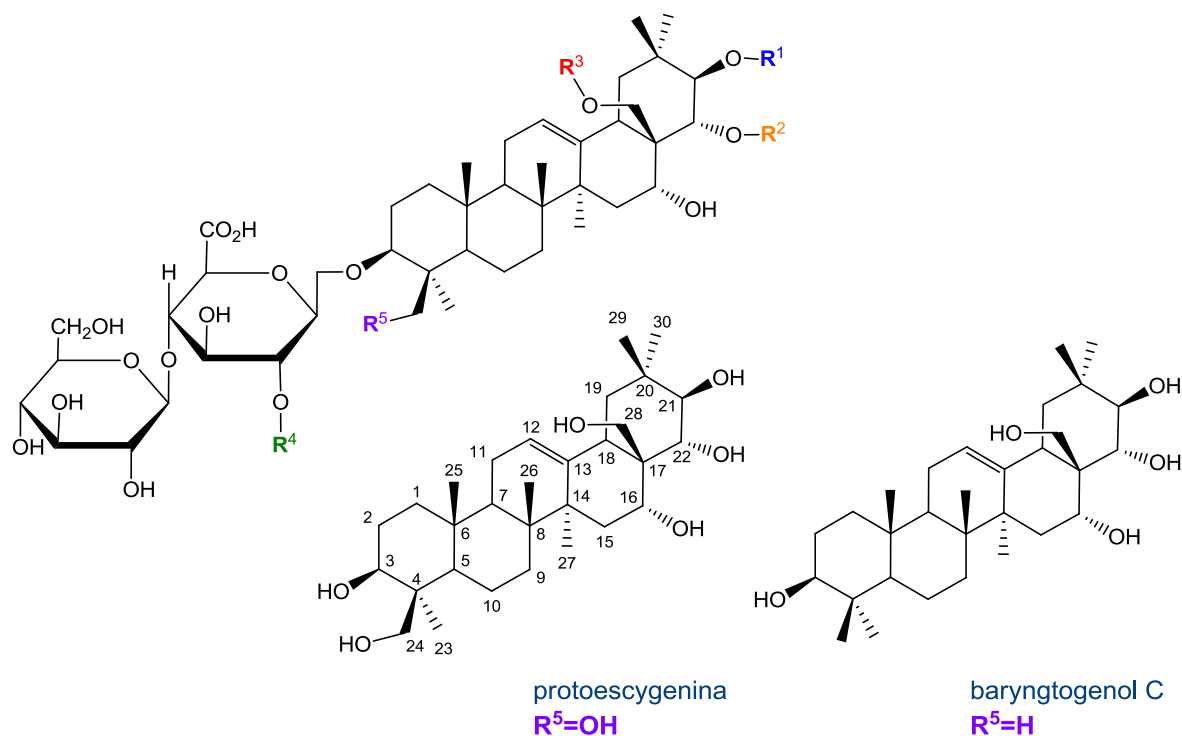
## 2.3 Escyna – struktura mieszaniny saponin

Jak już wspomniano we wstępie escyna jest mieszaniną złożonych glikozydów (saponin) pozyskiwaną z kasztanowca, które to saponiny zaliczamy do roślinnych wtórnych metabolitów powstałych w wyniku kolejnego działania trzech odrębnych typów przemian biogenetycznych: cyklizacji skwalenu, specyficznych hydroksylacji określonych trójterpenów i wreszcie selektywnych glikozylacji i/lub reakcji acylowania. W przypadku escyny w rezultacie pierwszego etapu powstają pentacykliczne trójterpeny z grupy pochodnych  $\beta$ -amyryny, głównie escygenina, protoescygenina, baryngtogenol C i baryngtogenol D (Rys. 6.), różniące się krotnością i pozycją podstawienia grupami hydroksylowymi. Zróżnicowanie strukturalne jest determinowane, oprócz struktury aglikonu, także typem podstawienia glikozydowego w pozycji C3 oraz rodzajem i pozycją grup acylowych występujących w pierścieniu E.

Jak już wspomniano próby poznania struktury saponin i terpenów wchodzących w ich skład podejmowano już w pierwszej połowie XX wieku, kiedy to Leopold Ruzicka zaproponował strukturę szkieletu trójterpenowego składającego się z jednostek izoprenowych. W jego metodzie kluczowe było przekształcanie terpenów w związki aromatyczne przez ich dehydrogenację i oparcie analizy struktury na nowo utworzonych układach aromatycznych, które w myśl jego teorii miały determinować budowę przestrzenną cząsteczki. Powrót do tematyki saponin i ich sapogenin, jednocześnie czas największego zainteresowania rozwijającymi się metodami poznania dokładnej struktury elementów składowych tak ważnego pod względem terapeutycznym indywiduum jak escyna, przypada na lata 60-te XX wieku. Wtedy to Tschesche i Wulff<sup>24,25</sup> oraz Kuhn i Löw<sup>26</sup> opublikowali szereg artykułów, w których opisali drogę do identyfikacji struktury escyny jako mieszaniny saponin oraz ich aglikonów – sapogenin.

Z ekstraktów mieszanin saponin izolowanych z nasion roślin rodziny *Aesculus* dotychczas wyodrębniono i zidentyfikowano kilkadziesiąt saponin. U większości z nich

łańcuch trisacharydowy z jednostką glukuronopiranozylową (glukoza, galaktoza, ksyloza) jest przyłączony w pozycji C3 aglikonu a funkcje acylowe w pozycjach C21, C22 i C28, rzadziej w pozycji C16. Obecne w związkach naturalnych tej klasy funkcje acylowe obejmują grupy angeloilową (ester kwasu *cis*-2-metylo-2-butenowego), tygloilową (ester kwasu *trans*-2-metylo-2-butenowego), acetylową, 2-metylobutanoilową i 2-metylopropanoilową. Skład mieszanin jest różny i zależy od gatunku oraz źródła pochodzenia surowca roślinnego. Skupiając się na składzie chemicznym mieszaniny pochodzącej z nasion kasztanowca *Aesculus hippocastanum* L. (występującego głównie na obszarach Europy i Ameryki Północnej), jej części składowe można zilustrować wzorem zaproponowanym przez Tscheschego (Rys. 6.).<sup>25</sup>



Escyna	Aglikon ( $R^5=OH, H$ )	C21-OR ( $R^1$ )	C22-OR ( $R^2$ )	C28-OR ( $R^3$ )	Glikozyd ( $R^4$ )	Zawartość w mieszaninie [%]
Ia	protoescygenina	Tig	Ac	H	Glc	15
Ib	protoescygenina	Ang	Ac	H	Glc	23
IIa	protoescygenina	Tig	Ac	H	Xyl	6
IIb	protoescygenina	Ang	Ac	H	Xyl	9
IIIa	baryngtogenol C	Tig	Ac	H	Gal	3
IIIb	baryngtogenol C	Ang	Ac	H	Gal	5
IV	protoescygenina	Ac	Ac	H	Glc	5



Escyna	Aglikon (R <sup>5</sup> =OH, H)	C21-OR (R <sup>1</sup> )	C22-OR (R <sup>2</sup> )	C28-OR (R <sup>3</sup> )	Glikozyd (R <sup>4</sup> )	Zawartość w mieszaninie [%]
<b>V</b>	protoescygenina	<i>i</i> PrCO-	Ac	H	Glc	7
<b>VI</b>	protoescygenina	(2-Me)-BuCO-	Ac	H	Glc	b.d.
<b>Iso-Ia</b>	protoescygenina	Tig	H	Ac	Glc	b.d.
<b>Iso-Ib</b>	protoescygenina	Ang	H	Ac	Glc	b.d.
<b>Iso-V</b>	protoescygenina	<i>i</i> PrCO-	H	Ac	Glc	b.d.

**Rys. 6.** Wzór strukturalny składników mieszaniny pochodzącej z nasion kasztanowca.

### 2.3.1 Escyna – fitofarmakologia i zastosowania kliniczne

Z fitochemicznego punktu widzenia nie sama escyna jest obiektem badań, ale ekstrakty saponinowe pochodzące z nasion *Aesculus*. Są one wykorzystywane między innymi w kuracjach przeciw żylakom, hemoroidom, gorączce, schorzeniach reumatoidalnych i wielu innych, podawane w postaci doustnej w dawkach około 0,5 – 1,2 ml/dzień. Dodatkowo stosowano preparaty pochodzące nie z nasion, lecz z kory i liści roślin *A. hippocastanum*, przy czym ekstrakty z kory oraz liści posiadają nieco bardziej rozbudowany skład niż ekstrakty z nasion. Oprócz mieszaniny saponin jaką jest escyna można w nich odnaleźć szereg związków naturalnych, między innymi glikozydy kumaryny (eskulina, skopolina i fraksyna) oraz ich aglikony, flawonowe glikozydy kwercetyny (kwercetyna, rutyna), które to składniki w nasionach nie występują w ogóle. Dzięki tym dodatkowym składnikom ekstrakty z kory i liści mają dużo szersze spektrum zastosowań, jednak obecnie odchodzi się od ich stosowania właśnie ze względu na zbyt duże skomplikowanie składu takich preparatów, a zatem trudny do przewidzenia wpływ na funkcjonowanie organizmu (skutki uboczne).

Analizując aktywność biologiczną wyizolowanej escyny (mieszaniny) przy podaniu doustnym wykazano silny efekt przeciwzapalny (zwłaszcza w początkowej fazie rozpoczynającego się stanu zapalnego), działanie hipoglikemiczne oraz zmniejszające wchłanianie etanolu. Odnotowano pozytywny efekt terapeutyczny w drobnych naczyniach krwionośnych i w ich otoczeniu tj. w tkankach łącznych. Tkanki te składają się z elementów komórkowych i włóknistych – w całości nazywanych tzw. substancją podstawową (lub matrycą zewnątrzkomórkową), która składa się z proteoglikanów i glikozaminoglikanów zapewniających wsparcie oraz amortyzację naczyniom

krwionośnym i towarzyszącym im tkankom włóknistym. Jednym z kluczowych elementów tej substancji podstawowej jest kwas hialuronowy, proteoglikan, który nadaje matrycy zewnątrzkomórkowej jej integralność (zwartość). Jedna z hipotez dotycząca obecności obrzęków związanych z niewydolnością żylną mówi, że aktywność hialuronidazy (enzymu powodującego rozkład kwasu hialuronowego) wpływa na zwiększenie wycieku płynu naczyniowego z naczyń włosowatych. Hipoteza ta bywa przytaczana w celu wyjaśnienia pozytywnych skutków działania ekstraktów kasztanowca na objawy niewydolności żylniej. W badaniach wykazano aktywność przeciw hialuronidazie więcej niż jednego składnika wspomnianych ekstraktów.<sup>27</sup>

Należy zwrócić uwagę na fakt, że escyna nie jest jedynym elementem ekstraktu kasztanowca będącym w stanie hamować aktywność hialuronidazy (innym jest np. proantocyjanidyna A2). W przypadku escyny hamowanie hialuronidazy zostało uznane za niewystarczające do przypisania tak silnych właściwości wenotonicznych (zapobieganie drenażowi naczyń) ekstraktu *A. hippocastanum* tylko jej obecności. Postawiono więc kolejną hipotezę mówiącą tym razem, że dopiero zahamowanie działania także innych enzymów, w tym kolagenazy, elastazy i  $\beta$ -glukuronidazy (wszystkie one biorą udział w określaniu integralności matrycy zewnątrzkomórkowej) wyjaśnia dlaczego ekstrakty *A. hippocastanum* wykazują znacznie wyższą skuteczność niż sama escyna.<sup>27</sup>

W uzupełnieniu do istniejących zastosowań w leczeniu niewydolności żylniej, preparaty zawierające związki fitochemiczne z kasztanowca mają zastosowanie chociażby w preparatach kosmetycznych. Wykorzystanie ekstraktów (zwłaszcza z nasion rośliny, te z liści i kory są gorzej scharakteryzowane), może prowadzić do wielu korzystnych zmian na skórze po podaniu miejscowym, np. działanie przeciwutleniające (zmniejszenia widocznych oznak starzenia się skóry), właściwości przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe, zmniejszenie zaczerwienień i obrzęków skóry (działanie na naczynia kapilarne i otaczającej je tkanki łącznej).

Ponieważ saponiny kasztanowca są tradycyjnym surowcem etnofarmakologicznym oraz stanowią substancje aktywne coraz większej liczby współczesnych preparatów farmaceutycznych, zaczęto uważniej przyglądać się im pod kątem naukowym – klinicznym. Przestały wystarczać proste wytłumaczenia mechanizmu działania dla mieszanin jakimi są

wyciągi roślinne. Badano coraz bardziej wnikliwie skład oraz wpływ poszczególnych składników ekstraktów na aktywność biologiczną.

Podstawowym efektem terapeutycznym, jaki w ostatnich latach potwierdzono klinicznie, jest wspomniane już korzystne działanie na chorobowe zmiany naczyń żylnych. Działanie przeciwzapalne na poziomie tkankowym pozwala przypuszczać, że saponiny i ich pochodne mogą być przydatne w terapii chorób układu krążenia, stanowiących jedno z podstawowych zagrożeń dla współczesnego człowieka.

Profil farmakologiczny (terapeutyczny) escyny został znacząco wzbogacony w ostatnich latach głównie dzięki badaniom nad zasadnością głównego klinicznego wskazania stosowania preparatów escynowych do leczenia przewlekłej niewydolności żyłnej (CVI). Większość pojawiających się w literaturze prac dotyczy wykorzystania ekstraktu z nasion kasztanowca (HCSE), który zawierał około 70% escyny. Wyniki wskazywały, że wyższa procentowa zawartość substancji aktywnej przekłada się na wyższą skuteczność terapeutyczną, dlatego wszystkie preparaty i leki z escyną w składzie powinny zawierać wyraźną informację o zawartości substancji aktywnej.

Co najmniej trzy grupy działań farmakodynamicznych są przypisywane escynie: przeciwobrzękowe, przeciwzapalne i zwiększające drożność naczyń krwionośnych. Wszystkie one biorą się z podstawowego mechanizmu molekularnego zidentyfikowanego jako selektywna przepuszczalność naczyńniowa. Właśnie dlatego escyna dołączyła do obecnie szeroko cytowanych w literaturze farmakologicznej narzędzi oceny wrażliwości tkanek naczyńniowych na działanie szerokiej gamy agonistów uczestniczących w mechanizmie nadciśnienia żylnego.

#### Działanie przeciwobrzękowe

Wykazano skuteczność escyny w zapobieganiu tworzenia się obrzęku w modelach zapalenia typu wstępnej fazy wysiękowej, takich jak: obrzęk indukowany w łapie szczura za pomocą szeregu czynników drażniących (owoalbuminy, dekstran, kulka bawełny, karagenina oraz bradykinina); surowicze zapalenie otrzewnej wywołane u szczurów przez wstrzyknięcie formaliny zaś u myszy karageniną.<sup>27</sup> Jednak działanie escyny nie jest uniwersalne, ponieważ jej skuteczność drastycznie maleje w zapobieganiu obrzękowi w modelach stanów zapalnych, które osiągają późną fazę proliferacyjną, takich jak obrzęk

wywołany przez formalinę oraz w modelach ziarniniaków (zgrupowanie komórek zapalnych towarzyszące licznym chorobom). Mechanizm działania przeciwzapalnego w wypadku obrzęku, oprócz wspomnianego wcześniej wpływu jonów ( $\text{Ca}^{2+}$ ), polega na efekcie „uszczelnienia” małych naczyń przepuszczalnych dla wody i jest związane z obniżoną aktywacją komórek śródbłonna indukowaną przez niedotlenienie.<sup>28</sup> W stanach zapalnych, podobnie jak w czasie zatorów krwi, w wyniku zmniejszonej podaży tlenu następuje redukcja ilości powstającego ATP w trakcie mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej. To z kolei prowadzi do sekwencji wydarzeń metabolicznych: uwalnianie prostaglandyn, tworzenie neutrofilii i na koniec aktywacja procesu prowadzącego do zastoju żylnego i obrzęku jaki obserwujemy w przypadku np. żylaków. Działanie terapeutyczne escyny polega na sprawnym zapobieganiu zmniejszania się ilości ATP i zwiększeniu ilości fosfolipazy A2 odpowiedzialnej za uwalnianie mediatorów prekursorów zapalnych oraz zmniejszanie odpowiedzi neutrofilii w wyniku czego zmniejszeniu ulega obrzęk żylny.<sup>27,29</sup> Jako przykład klinicznie potwierdzonej skuteczności escyny na zwiększone ciśnienie kapilarne obserwowane w stanach obrzękowych chorób żylnych, przeprowadzono u 24 kobiet cierpiących na przewlekłą niewydolność żylną rozpoznanie a następnie stosując odpowiednio zaplanowaną metodologię postępowania zaobserwowano kliniczną oraz statystyczną poprawę stanu zdrowia - 2% w przypadku placebo i 22% w przypadku podawania escyny.<sup>30</sup> Ponadto w badaniach tych zwrócono uwagę na zdolność do hamowania enzymów – elastazy i hialuronidazy uzupełniających „uszczelniające” działanie escyny<sup>31</sup> o czym była już mowa wcześniej. Te dwa enzymy biorą udział w degradacji proteoglikanów będących ważnymi składnikami śródbłonna naczyniowego i głównym elementem składowym macierzy zewnątrznaczyniowej. Escyna może przesunąć równowagę pomiędzy syntezą i degradacją proteoglikanów w kierunku syntezy, wzmacniać ściany naczyń włosowatych i zapobiegać wyciekom. Hipotezę tę udokumentowano badając mikroskopem elektronowym zwierzęta, którym podano znakowane mukopolisacharydy i pokazując, że ich rozkład w tkance łącznej szczurów jest znacząco zmniejszony po dootrzewnowej kuracji escyną.<sup>27</sup>

## Działanie przeciwzapalne

Przeciwzapalne właściwości escyny dobrze ilustruje obserwacja zmniejszenia ziarniniaka zapalnego u szczura.<sup>32</sup> Działanie przeciwzapalne jest trudne do odróżnienia od wpływu przeciwobrzękowego w stosowanych klinicznie modelach zapalenia opłucnej i ostrego obrzęku powstałego na skutek blokady obiegu limfatycznego u szczurów. Przeprowadzono badania wykonane techniką zwaną „skin window” opracowaną przez Rebuck’a i Crowley’a mierzącą ilość leukocytów, neutrofili i makrofagów w wysięku towarzyszącemu przewlekłej niewydolności żyłnej. Podanie escyny poskutkowało 33% zmniejszeniem gęstości leukocytów na jednostkę powierzchni, zaobserwowano także zmiany jakościowe, makrofagi zmniejszyły się o około 50%, a ich zastępowanie przez neutrofile zwiększyło się o 46%.<sup>27</sup> Przytoczone wyniki sugerują, że escyna może skutecznie przeszkadzać w fazie komórkowej procesu zapalnego, czyli w aktywacji leukocytów. Potwierdzeniem tej hipotezy może być tłumienie migracji leukocytów w jamie opłucnej w modelu zapalenia opłucnej u szczurów i badaniach nad aktywacją komórek śródbłonna, które wskazują na wpływ escyny na zmniejszenie przyczepności neutrofili i powiązane z tym uwalnianie mediatorów zapalnych.<sup>32</sup> U szczura hamowaniu obrzęku stopy oraz opłucnej indukowanego karageniną towarzyszy znaczne zmniejszenie peroksydacji lipidowej, przy czym eksperymenty te były przeprowadzane dla nie oczyszczonego HCSE, istnieją jednak dowody na zwiększoną aktywność wyizolowanej oczyszczonej escyny.<sup>33</sup> Innym dobrym przykładem dobroczynnego wpływu escyny jest zjawisko zmniejszonej przepuszczalności naczyń włosowatych skóry u szczurów powodowana wzrostem ilości receptorów serotoninowych 5-HT i histaminy, gdzie escyna pełni rolę selektywnego antagonisty 5-HT.<sup>32</sup> Niezależnie podobny efekt potwierdzono w badaniach nad przyspieszeniem tranzytu jelitowego u myszy, gdzie po doustnym podaniu dochodzi do selektywnej aktywacji receptora 5-HT2 będącego antagonistą pro-zapalnego receptora 5-HT1.<sup>34</sup>

## Udrożnianie naczyń krwionośnych

Wystawienie żył psa na działanie HCSE lub escyny prowadzi do znacznego wzrostu ich kurczliwości. Ilość skurczów zwiększa się o 50% wartości obserwowanej u zwierząt wystawionych wcześniej na działanie noradrenaliny, taką samą reakcją zaobserwowano

zarówno w normalnych jak i zmienionych patologicznie żyłach.<sup>32</sup> W badaniach klinicznych *in vitro* na ludzkiej żyłce odpiszczelowej potwierdzono wpływ wyizolowanej escyny na zwiększanie drożności naczyń krwionośnych (właściwości wenotoniczne).<sup>35</sup> Największe skurcze naczyń osiągnięto dla stężenia  $10^{-3}$  M, przy czym widoczne stają się już przy stężeniach  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M (dla porównania dla noradrenaliny maksymalne skurcze występują już przy stężeniu  $10^{-7}$  M). Przedstawione w literaturze krzywe zależności odpowiedzi komórkowej do dawki escyny dla 10 różnych preparatów wskazują na wzrost przepustowości żyły o 10-20% przy zastosowaniu stężeń poniżej  $10^{-7}$  M, a takie właśnie stężenia są bezpieczne przy podaniu doustnym. Opisany przez grupę Berti z Mediolanu mechanizm zwiększenia napięcia żylnego jest wyraźnie związany ze wzrostem wytwarzania prostaglandyn F2 $\alpha$  w ludzkich żyłach.<sup>36</sup> Escyna w stężeniu  $10^{-3}$  M lub niższym powodowała wyraźny wzrost kurczliwości izolowanych ludzkich żył odpiszczelowych, przy czym działanie to zanikało po ekspozycji na indometacynę (lek przeciwzapalny o działaniu inhibitora prostaglandyn) a wracało ponownie po 2 godzinach od odstawienia środka przeciwzapalnego.

#### Działanie terapeutyczne w przewlekłej niewydolności żylniej

Zespół przewlekłej niewydolności żylniej (CVI) jest schorzeniem diagnozowanym u ok. 10-15% mężczyzn oraz 20-25% kobiet w wieku średnim, wielu z nich wymaga hospitalizacji i interwencji chirurgicznej, stąd tak ważne są badania przeprowadzane na HCSE i samej escynie. Badania kliniczne z wykorzystaniem podawanego doustnie ekstraktu zawierającego escynę raportowali między innymi Pittler i Ernst<sup>37</sup> oraz Bielański i Piotrowski<sup>38</sup>. Badania tych pierwszych prowadzono na znaczącej puli pacjentów (kilkaset osób), z uwzględnieniem grup placebo, dały wiarygodne wyniki, według których codzienna dawka escyny przez okres od 2 do 8 miesięcy spowodowała zmniejszenie obwodu chorej nogi oraz objawów towarzyszących takich jak ból, zmęczenie, uczucie napięcia, świąd) w porównaniu do pacjentów z grupy placebo. Stopień zmian stanu zdrowia wyraźnie różnił się w obrębie badanych grup, niemniej jednak wyniki są bezdyskusyjne, a co ważniejsze wykazano, że stosowaniu escyny nie towarzyszą żadne istotnie groźne efekty uboczne. Porównanie skuteczności escyny wobec innych metod leczenia przewlekłej niewydolności żylniej wskazało na zbliżone własności terapeutyczne do terapii uciskowej (50% pacjentów

jej nie toleruje, leczenie escyną stanowi ciekawą alternatywę) oraz terapii hydroetylorutozydem (główny, wzorcowy lek stosowany w CVI).<sup>37</sup> Warto także wspomnieć o zakrojonych na szeroką skalę badaniach klinicznych prowadzonych przez National Association of General Practitioners z Niemiec, które porównało wyniki terapii CVI u ponad 5400 pacjentów, gdzie poprawę stanu zdrowia stwierdzono aż u 95% z nich, natomiast odsetek pacjentów u których wystąpiły skutki uboczne był znikomy (poniżej 0,6%) a same skutki uboczne mało dokuczliwe.

### Hemoroidy

W dziedzinie chorób żylnych hemoroidy zajmują pozycję nieco wstydliwą ze swej natury ale i ważną z klinicznego punktu widzenia. Większość, jeśli nie wszystkie preparaty wykorzystywane w terapii są przewidziane do użytku miejscowego, a i tych leków nie jest na rynku zbyt wiele (w ostatnich latach ulega to zmianie). Skuteczność oraz bezpieczeństwo 2-miesięcznego doustego stosowania escyny u 80 pacjentów cierpiących na ostre objawowe żylaki odbytu badano w porównaniu do ślepej próby i grupy placebo.<sup>39</sup> Skuteczność terapeutyczną oceniano na podstawie prywatnej opinii pacjenta, nasilenia objawów oraz wyników oceny endoskopowej. Ponad 80% pacjentów odnotowało poprawę (w porównaniu do niespełna 30% w grupie placebo) po zakończeniu kuracji, badania endoskopowe potwierdziły polepszenie stanu naczyń żylnych oraz zmniejszenie obrzęku, co ciekawe pierwsze efekty były widoczne już po 6 dniach stosowania escyny, co stawia ją na czele w szybkości połączonej ze skutecznością działania.

## 2.4 Reaktywność grupy hydroksylowej w układach polihydroksylowych

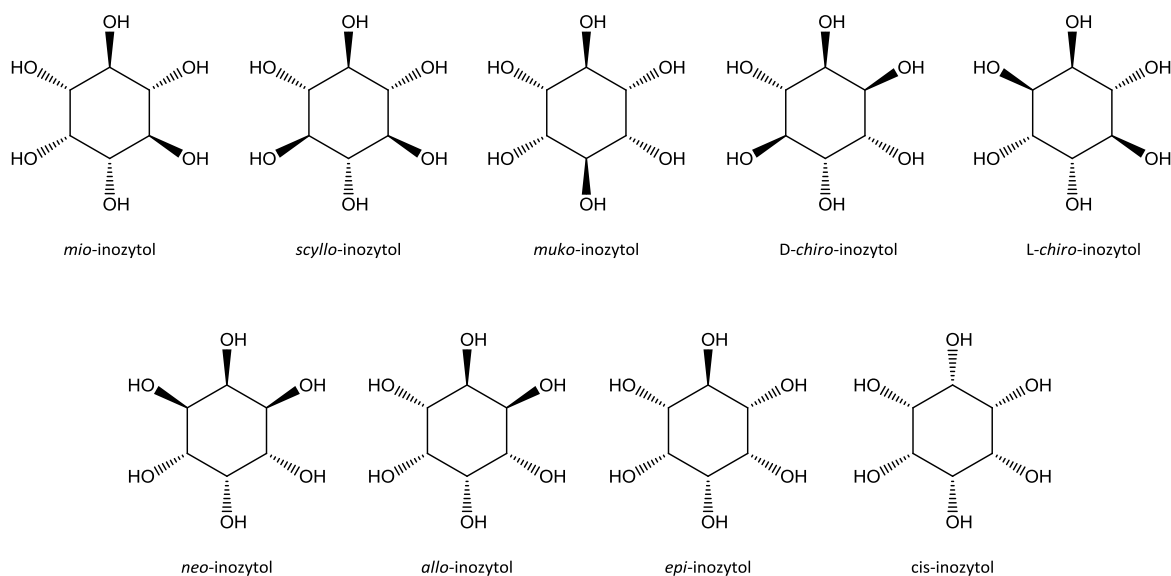
Przeprowadzenie reakcji w pełni selektywnej, na konkretnej grupie hydroksylowej w związku di-, tri- lub polihydroksylowym, stanowi prawdziwe syntetyczne wyzwanie i wpisuje się w stały trend badań nad związkami polihydroksylowymi (sacharydy, inozytyle).<sup>40-44</sup> Selektywne przemiany grup hydroksylowych w cząsteczkach takich klas jak cukry czy aglikony wielu saponin (trójterpeny) odgrywają kluczową rolę w syntezie związków o znaczeniu biologicznym, farmakologicznym oraz medycznym.<sup>45-53</sup> W związkach polihydroksylowych (poliolach) różnice w reaktywności objawiają się między

innymi poprzez selektywne reakcje pierwszorzędowego hydroksylu z elektrofilem w obecności drugo- i trzeciorzędowego; preferowanie ekwatorialnego hydroksylu przed aksjalnym w układzie cykloheksanopoliolu; preferowanie tworzenia acetalu w układzie *cis* przed *trans* w wicynalnym diolu cyklicznym i tym samym hydrolizy acetalu w układzie *trans* przed *cis*<sup>54,55</sup> oraz tworzenie acetalu w układzie *trans* przed *cis* w wicynalnym diolu acyklicznym.<sup>56-59</sup> W syntezie wykorzystuje się ponadto zróżnicowanie podczas hydrolizy oraz redukcji ortoestrów i ketali układów dioli i trioli.<sup>60-68</sup> Kwestia reaktywności, a z nią selektywności reakcji ulega skomplikowaniu jeśli wszystkie obecne w cząsteczce hydroksyle są drugo- lub trzeciorzędowe, ponieważ w takim przypadku różnice reaktywności bywają niewielkie, a otrzymane izomeryczne produkty trudno się różnicują (np. w procesie oczyszczania chromatograficznego lub przez krystalizację).

### Inozytyle

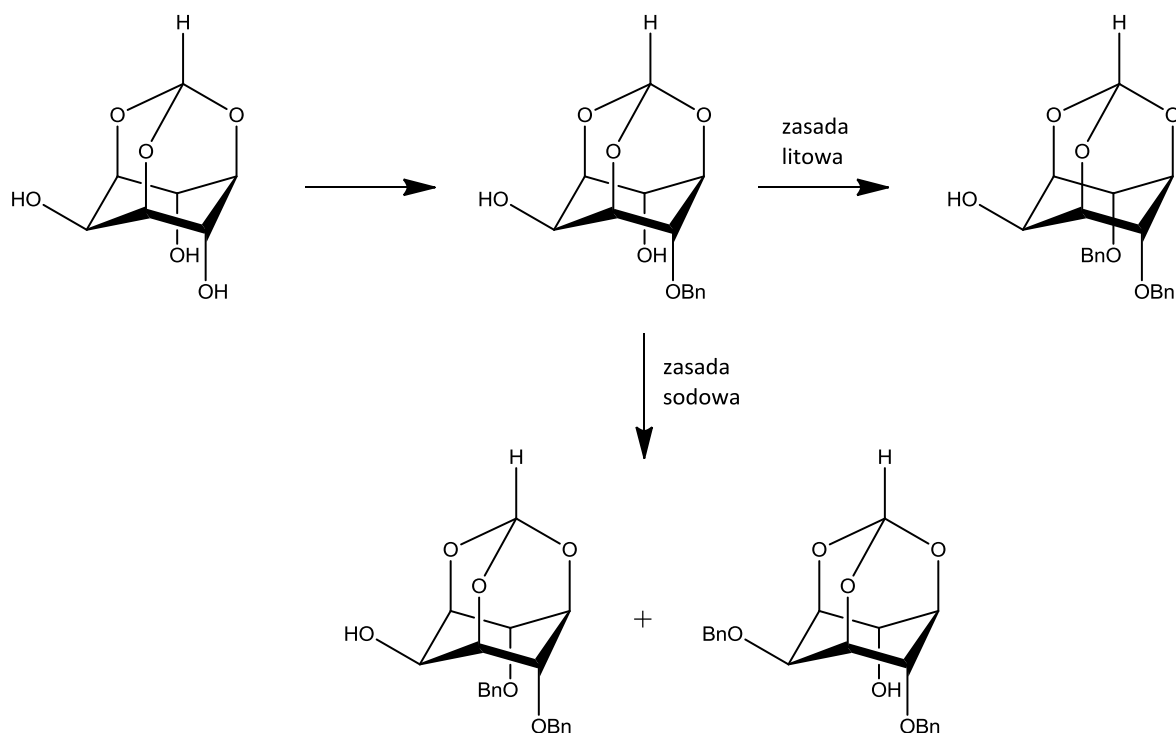
Grupa związków oparta na strukturze heksahydroksycykloheksanu (nazywana dla uproszczenia inozytolami) stanowi potencjalnie bardzo użyteczną podstawę do syntez skomplikowanych cząsteczek pochodzenia naturalnego.<sup>48,50,51,53</sup> Ze względu na znaczenie biologiczne fosforylowanych pochodnych inozytoli oraz zastosowanie ich pochodnych w farmakologii jako inhibitorów enzymów, badanie chemii tego typu polihydroksylowych związków jest przedmiotem licznych prac badawczych w ostatnich latach.<sup>49,69-74</sup> Inozytol to związek z grupy tzw. cukroli o strukturze sześciowęglowego cyklicznego heksaolu, przy czym wyróżnia się 9 jego stereoizomerów (Rys. 7.). Selektywna funkcjonalizacja mio-inozytolu (najpopularniejszy izomer; *cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-cykloheksanoheksaol) posiadającego sześć hydroksyli drugorzędowych o podobnym otoczeniu chemicznym stanowi dla syntetyka duże wyzwanie. Dlatego użytecznym staje się zabezpieczenie niektórych grup przez acetale/ketale lub ortoestry, dzięki czemu pozostałe wolne grupy zaczynają się wyraźniej różnicować a ich reaktywności, przy zachowaniu odpowiednich warunków, mogą zmienić się na tyle by umożliwić selektywność dalszych modyfikacji.





**Rys. 7.** Konfiguracje stereoizomerów inozytolu.

Na różnice w reaktywności hydroksyli inozytolu uwagę zwrócił między innymi Devaraj, który badając kompleksowanie jonów metali alkalicznych przez pochodne inozytolu zauważył różnice w sile kompleksowania w zależności od tego, które atomy tlenu brały udział w wiązaniu jonów metalu.<sup>75</sup> Obserwacje te skłoniły do dalszego badania regioselektywności, tym razem na przykładzie reakcji benzylowania ortoestrów *mio*-inozytolu w obecności mocnych zasad. Doświadczenia wykazały, że stosując zasadę litową można uzyskać lepsze (w stosunku do analogicznej zasady sodowej) rozróżnienie trzech wolnych grup hydroksylowych (dwie w położeniu aksjalnym i jedna ekwatorialnym) podczas ataku odczynnikami elektrofilowym. I tak w reakcji ortomrówczanu *mio*-inozytolu z zasadą a następnie bromkiem benzylu otrzymano mieszaninę dwóch eterów dibenzylowych (benzyl w pozycji aksjalnej i ekwatorialnej) dla zasady sodowej, z kolei przy zastosowaniu zasady litowej w tej samej reakcji powstał jeden dibenzylowy produkt – z benzylami w pozycjach aksjalnych (Schemat 4.). W tym przypadku zaobserwowana regioselektywność przy zastosowaniu zasad przypisywana jest stabilności chelatów tworzonych przez kation metalu i tlen grup hydroksylowych w różnych położeniach. Dalsze eksperymenty na zabezpieczonych w inny sposób (acetalo-, benzylo-, alliloksy-) pochodnych inozytolu doprowadziły do wniosku, że źródłem selektywności w tego typu reakcjach O-substytucji jest położenie *cis* reagującej grupy hydroksylowej względem zabezpieczonego tlenu wicynalnej grupy.



**Schemat 4.** Regioselektywność w reakcji benzylowania ortoestrów *mio*-inozytolu.

#### Monosacharydy<sup>76-78</sup>

W monosacharydach heterocykliczny charakter a więc obecność tlenu w pierścieniu prowadzi do dużo większego zróżnicowania obecnych w strukturze grup hydroksylowych. W pięciocłonowych (furanozy) oraz sześciocłonowych (piranozy) cyklicznych strukturach monosacharydów można wyróżnić dwa „typy” grupy hydroksylowej: anomeryczną (hemiacetalową) oraz trzy rodzaje alkoholowej (pierwszorzędowa grupa hydroksylowa - zawsze egzocykliczna względem pierścienia, endocykliczna drugorzędowa grupa hydroksylowa oraz rzadziej egzocykliczna drugorzędowa grupa hydroksylowa). Dalsze zróżnicowanie to aksjalna i ekwatorialna orientacja w dominujących (krzesłowych) konformacjach pierścieni piranozowych.

Reaktywność anomerycznej grupy hydroksylowej, która jak wspomniano ma strukturę cyklicznego hemiacetalu (laktolu) pod wieloma względami znacząco różni się od pozostałych grup hydroksylowych w monosacharydach. Pierwszą cechą charakterystyczną jest łatwość utlenienia (zarówno w przypadku aldopiranoz jak i aldofuranoz) do odpowiedniego glikonolaktonu za pomocą roztworu bromu, przy czym pozostałe grupy hydroksylowe pozostają nietknięte. Po drugie anomeryczna grupa hydroksylowa może być

zastąpiona przez grupę alkoksylową w reakcji monosacharydu z alkoholem przy użyciu bezwodnego kwasu mineralnego np. gazowego chlorowodoru dając glikozyd alkoholu (pozostałe hydroksyle tej reakcji nie ulegają). Właśnie ta zdolność monosacharydów do ulegania tak selektywnej reakcji jak wspomniane glikozydowanie wydaje się najważniejszą z punktu widzenia syntezy cechą węglowodanów. Znalazła ona szerokie zastosowanie w otrzymywaniu biologicznie aktywnych oligomerów i polisacharydów a także glikozydowania innych cząsteczek cennych biologicznie, takich jak białka, lipidy czy steroidy (trójterpeny).

Reaktywność pozostałych grup hydroksylowych (czyli z wyłączeniem grupy anomerycznej) jest kontrolowana przez kilka czynników. Po pierwsze reaktywność zależy od rzędowości, a więc bierzemy pod uwagę grupę hydroksylową pierwszo- czy drugorzędową. Jak wiadomo w zdecydowanej większości przypadków to pierwszorzędowe grupy hydroksylowe wykazują się wyższą reaktywnością niż drugorzędowe, co sugeruje, że różnica w reaktywności jest wyraźnie powiązana z zawadą steryczną, łatwiejszym bądź utrudnionym dostępem do miejsca planowanej transformacji. Ten sam czynnik steryczny jest najprawdopodobniej odpowiedzialny za większą reaktywność drugorzędowych egzocyklicznych (nie przyłączonych do pierścienia) grup względem położonych bezpośrednio przy pierścieniu (endocyklicznych). Z kolei różnica reaktywności pomiędzy drugorzędowymi grupami położonymi przy pierścieniu powodowana jest czynnikiem stereoelektronowym oraz zdolnością poszczególnych grup do tworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych z tlenem sąsiadujących grup hydroksylowych lub alkoksylowych. Różnice wynikają ponadto z zależności reaktywności grupy od jej pozycji w pierścieniu (czy to pięcio- czy sześciocłonowym) oraz od konfiguracji względem tego pierścienia (położenie aksjalne lub ekwatorialne) - o wadze tego ostatniego było już wspomniane przy omawianiu benzyłowaniu inozytolu.

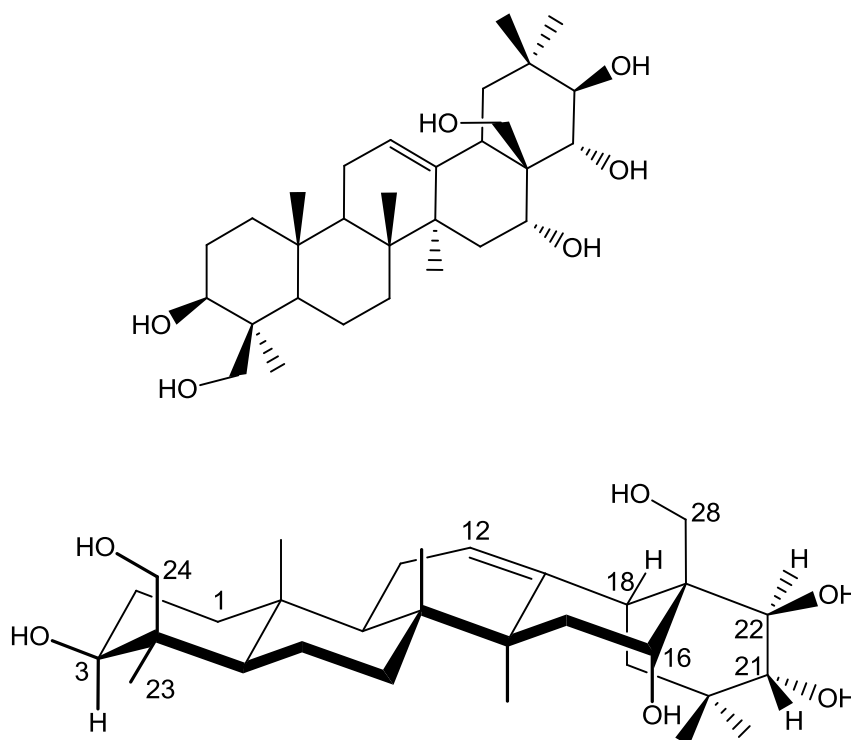
Względna reaktywność poszczególnych grup hydroksylowych monosacharydów zależy ponadto w znacznym stopniu od typu reagentów i odczynników, które są użyte do konkretnego przekształcenia.

## Terpeny

Przykładów literaturowych mówiących o reaktywności w polihydroksylowych terpenach nie spotyka się wiele w syntezie organicznej. Co prawda związków o szkielecie na przykład oleanenu z wieloma hydroksylami znanych jest w naturze całkiem niemała ilość, m.in.: barrigenole, barringtogenole, teasapogenole, saikogeniny i wiele więcej,<sup>79-81</sup> jednak ze względu na skomplikowanie struktury oraz kłopoty z wyodrębnieniem tych związków w większej skali ze źródeł naturalnych, relatywnie niewielu chemików decyduje się na szczegółowe badanie tej klasy związków.

Analizując reaktywność grup hydroksylowych w terpenach, w szczególności skupiając się na polihydroksylowych trójterpenach, należy brać pod uwagę te same czynniki, o których była mowa przy inozytolach (i alditolach). Podobieństwo tych dwóch układów cyklicznych przekłada się na analogiczne zależności reaktywności od położenia oraz stereochemii. Jednak w trójterpenach złożoność struktury jest dużo większa, zatem zaczyna mieć znaczenie nie tylko położenie podstawnika hydroksylowego względem pierścienia do którego jest przyłączony, ale także pozostałych pierścieni w układzie skondensowanym oraz, co oczywiste, względem różnych grup przyłączonych do sąsiadujących pierścieni cząsteczki. Zyskują na znaczeniu efekty steryczne oraz oddziaływania między grupami leżącymi daleko w cząsteczce jednak blisko siebie w przestrzeni (np. na skutek wygięcia cząsteczki spowodowanego przeprowadzanymi transformacjami).

Przykładem, w którym wspomniane powyżej zależności są dobrze widoczne, jest protoescygenina (**1**, podrozdziały 2.3 oraz 3.1). Jeżeli spojrzeć na „płaski” wzór strukturalny tak skomplikowanej cząsteczki (Rys. 8., u góry), pewne zależności i wzajemne relacje między jej elementami mogą nie być widoczne i tak oczywiste. Kiedy jednak przestawi się strukturę w sposób bardziej przestrzenny (Rys. 8., u dołu), pokazujący jak układają się pierścienie policyklicznego szkieletu trójterpenowego oraz jak względem siebie położone są podstawniki, dużo łatwiej wyciągnąć wnioski dotyczące reaktywności obecnych grup funkcyjnych.



**Rys. 8.** Wzór protoescigeniny (**1**) przedstawiony w różnych konwencjach stereochemicznych.

Analizując przestrzenną strukturę protoescigeniny można dojść do kilku ogólnych wniosków. Pierwszorzędowe grupy hydroksylowe (w pozycji C24 oraz C28) są mocno wyeksponowane ponad płaszczyznę cząsteczki. Takie ich położenie, wraz z rzędowością, dają tym grupom niemal bezwzględne pierwszeństwo w licznych reakcjach, m.in. podstawienia z udziałem szerokiej gamy odczynników elektrofilowych. Z kolei grupa hydroksylowa w pozycji C3 odgrywa istotną rolę, ponieważ jest miejscem przyłączenia części cukrowej w saponinie. Jednak ze względu na mniejszą reaktywność jako grupy drugorzędowej, jej funkcjonalizacja może stanowić duży problem syntetyczny. Transformacje w tym miejscu stają się jeszcze trudniejsze jeśli pozycja C24 jest podstawiona grupą sterycznie rozbudowaną (np. grupą zabezpieczającą) utrudniającą podejście reagentów do grupy C3-OH. Kolejną obserwacją jest bliskość w przestrzeni grup hydroksylowych C16 i C22 (co nie jest aż tak widoczne w rzucie „płaskim”), dzięki czemu mogą one reagować podobnie do układu 1,2-diolu (diol wicynalny), np. w reakcji ketalizacji (podrozdział 3.3.1.1), mając pierwszeństwo przed podobną reakcją pomiędzy hydroksylami w pozycji C21 i C22 (ponadto, jak wspomniano wcześniej układ *trans* nie sprzyja tworzeniu acetalu).

## 2.5 Metodologia grup zabezpieczających w chemii polihydroksylowych związków organicznych

### 2.5.1 Pozycja grup zabezpieczających we współczesnej syntezie organicznej

Grupami zabezpieczającymi mogą być indywidua chemiczne o zróżnicowanej strukturze, zarówno bardzo skomplikowane cząsteczki o wysokich masach molowych jak również proste, kilkuatomowe molekuly. Kryteriów, które kwalifikują cząsteczkę do zastosowania strategii grup zabezpieczających jest kilka, przy czym nie zawsze spełnione są wszystkie z nich. W największym uproszczeniu wymienić możemy osiem warunków, które świadczą o tym że mamy do czynienia z dobrą grupą zabezpieczającą:<sup>82,83</sup>

- ✓ Jej wprowadzenie oraz usunięcie powinno być nieskomplikowane i wydajne,
- ✓ Reagenty konieczne do jej wprowadzenia powinny mieć możliwie niską cenę i być łatwo dostępne,
- ✓ Powinna być łatwa w analizie oraz nie powodować dodatkowego skomplikowania cząsteczki docelowej (np. nowe centrum stereogeniczne),
- ✓ Powinna być stabilna w warunkach rozdzielania chromatograficznego,
- ✓ Preferowane są grupy z możliwie najszerszym wachlarzem dopuszczalnych warunków reakcyjnych,
- ✓ Powinna dawać możliwość selektywnego zdejmowania w specyficznych warunkach,
- ✓ Produkty uboczne jej zakładania oraz zdejmowania powinny być łatwo oddzielane od mieszanin reakcyjnych,
- ✓ Powinna spełniać wymagania „zielonej chemii” w skali technicznej.

Wypełnienie tych warunków w znaczącym stopniu utrudnia posługiwanie się metodami syntezy z użyciem grup zabezpieczających. Wiele uwagi poświęcić trzeba takiemu zaprojektowaniu szlaku syntezy by zabezpieczenia nie przeszkadzały sobie wzajemnie, by możliwe były przekształcenia w jednym miejscu cząsteczki bez obawy o odporność innych jej elementów. Dobór właściwych odczynników (których wybór często w praktyce mamy ograniczony) stanowi kolejny problem, z którym należy sobie poradzić. Informacje dostępne w literaturze, mimo że wiarygodne nie zawsze okazują się sprawdzać

w konkretnym przypadku. Eksperymentator musi doświadczalnie dobierać i weryfikować metody zabezpieczania, jakich chce użyć, co przekłada się na szybkość i efektywność działania. Każda taka grupa wykorzystana w szlaku syntetycznym wydłuża go o dwa etapy (wprowadzenie a następnie usunięcie), a niejednokrotnie konieczne jest zablokowanie dwóch lub więcej grup funkcyjnych o odmiennym charakterze chemicznym. Im więcej dodatkowych etapów tym mniejsza wydajność całego szlaku i tym wyższy jego koszt (dwa szczególnie ważne parametry np. w przemyśle farmaceutycznym).

Pomimo pewnych wad metodologii grup zabezpieczających jest to niezbędny element syntezy organicznej, którym musimy się systematycznie posługiwać kiedy mamy do czynienia z wielofunkcyjnymi substratami. Transformacje oraz wszelkie funkcjonalizacje wiążą się z wprowadzeniem zabezpieczeń w miejscach, które mają na danym etapie pozostać nienaruszone - zwłaszcza jeśli w cząsteczce obecnych jest kilka takich samych lub podobnych grup funkcyjnych.

### *2.5.2 Grupy zabezpieczające dla grupy hydroksylowej (oraz dioli, trioli etc.)*

Grupy hydroksylowe, zarówno alifatyczne, alicykliczne jak i aromatyczne są prawdopodobnie najbardziej rozpowszechnioną w przyrodzie grupą funkcyjną. Niezliczone przykłady ugrupowania hydroksylowego znajdziemy między innymi w takich klasach związków jak nukleozydy, sacharydy, steroidy, flawonoidy a także niektóre peptydy i większość białek. Ze względu na wielokierunkową reaktywność wynikającą z heterolitycznego lub homogenicznego rozpadu wiązania O-H oraz podatności atomu tlenu na protonowanie i koordynację reagentów elektrofilowych (w tym kwasów Lewisa i kationów metali), mierzalną kwasowość ( $pK_a$  15-17) oraz znaczną nukleofilowość hydroksyl wykazuje potencjalnie wysoką reaktywność w reakcjach utlenienia, alkilowania, acylowania oraz dehydratacji nawet w łagodnych warunkach. Dlatego wiele uwagi poświęcono na opracowanie metod blokowania grupy hydroksylowej przed niepożądanymi transformacjami.<sup>82,83</sup> Podstawowych grup zabezpieczających znanych jest ponad 200 – podzielonych generalnie na dwie klasy związków: etery (np. silylowe, alkilowe, alkoksylowe) oraz estry i węglany.

W przypadku gdy alkohol ma więcej grup hydroksylowych w położeniu 1,2- lub 1,3- dysponujemy szeregiem dodatkowych metod. Takie układy diolowe można zabezpieczać w postaci cyklicznych acetalu lub ketali, cyklicznych ortoestrów oraz pochodnych sililowych o specyficznej budowie, która umożliwia wiązanie dwóch grup hydroksylowych.

Porównując  $pK_a$  dla aromatycznych grup hydroksylowych do grup alicyklicznych wartość ta zawiera się w zakresie 7-10, zatem różnica jest wyraźna, co wpływa na przebieg procesu zarówno zakładania jak zdejmowania zabezpieczeń. Pomimo tego aromatyczna grupa hydroksylowa pod wieloma względami zachowuje się analogicznie do tej z alkoholi alicyklicznych, więc przeważająca większość metod jest z powodzeniem stosowana i w tym przypadku – czasem konieczna staje się jedynie niewielka modyfikacja warunków.

Spektrum możliwości zastosowania zabezpieczeń grupy hydroksylowej wzrasta w znaczący sposób, gdy wykorzystamy metody enzymatyczne. Metody te stosowane są w syntezie organicznej do naśladowania procesów zachodzących naturalnie w organizmach żywych. W szerokiej gamie takich reakcji znajdują się między innymi acylowanie, fosforylowanie, dehydrogenacja, hydroksylowanie czy też przeniesienie podwójnego wiązania. Największą zaletą reakcji wspomaganych enzymatycznie jest ich selektywność i łagodne warunki. Ze względu na obszar zainteresowania prezentowany w niniejszej pracy szczególną uwagę zwracają przemiany pozwalające na selektywne acylowania i/lub deacylowania, głównie z pomocą enzymów z klasy lipaz.<sup>84-87</sup>



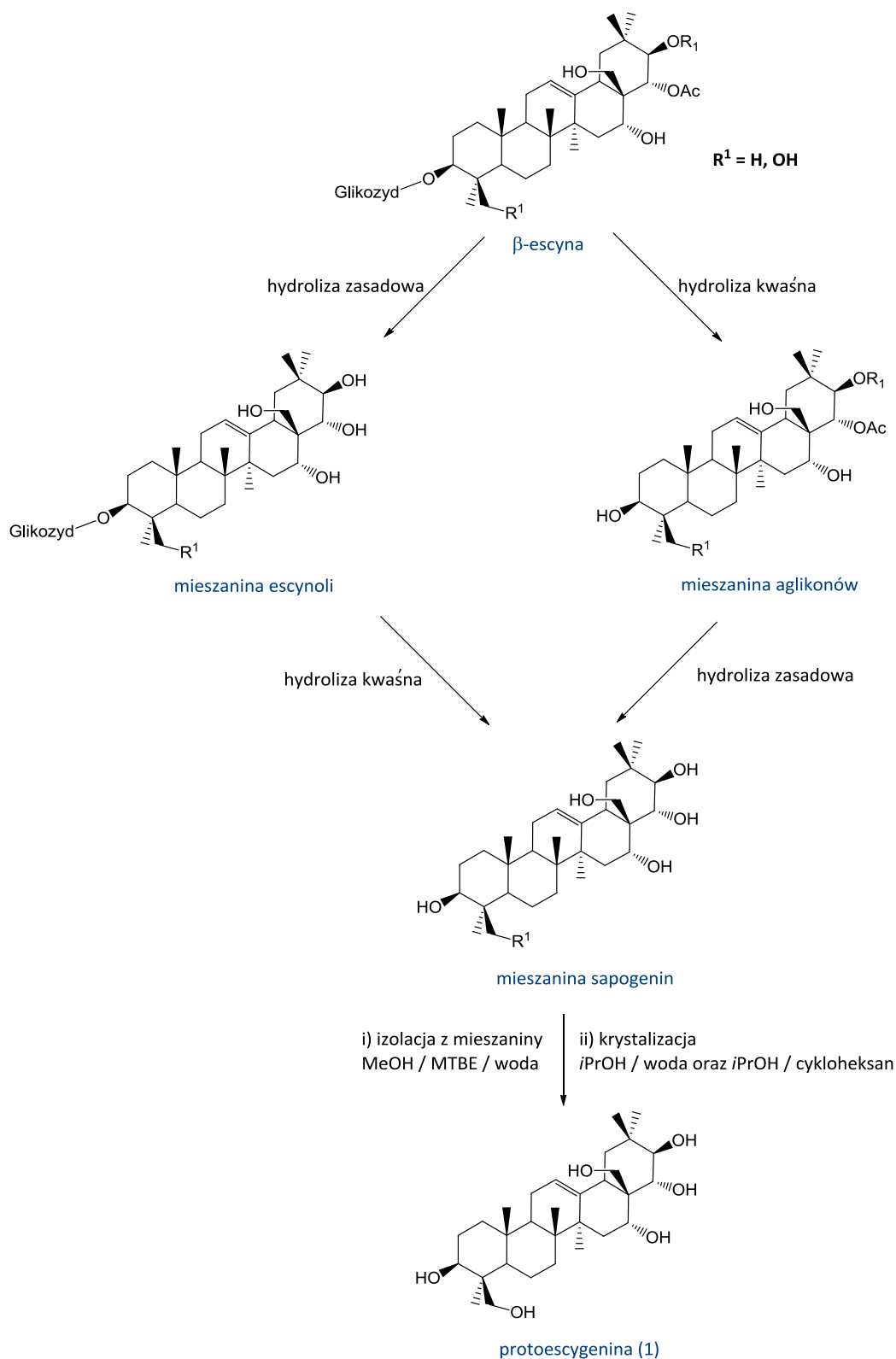
### 3 Badania własne

#### 3.1 Pozyskanie związku wyjściowego – protoescygeniny z naturalnej mieszaniny saponin – escyny.

Ze względu na technologiczny aspekt projektu, w ramach którego prowadzone były eksperymenty wchodzące w zakres niniejszej tezy, konieczne było opracowanie skutecznej oraz wydajnej metody pozyskiwania jednego z aglikonów escyny – protoescygeniny (1), w oparciu o krytyczną ocenę stanu techniki, wynikającą z własnego przeglądu literatury naukowej oraz analizy patentowej wykonanej przez kwalifikowanych rzeczników Instytutu Farmaceutycznego. Był to kluczowy element całej planowanej koncepcji prac syntetycznych ze względu na to, że aglikon ten miał stanowić związek wyjściowy do wszystkich planowanych syntez. Dotychczasowy stan wiedzy dostępny w literaturze opisywał metody otrzymywania tego typu związków na małą skalę przy użyciu metod chromatograficznych.<sup>88-99</sup> Escynę poddawano hydrolizie kwaśnej pozbawiając podstawników sacharydowych, po czym w kolejnym kroku hydrolizowano estry w warunkach zasadowych (podobny efekt osiągnęto także przy użyciu metod enzymatycznych). Bez względu na sposób hydrolizy otrzymane mieszaniny saponin rozdzielało i oczyszczano chromatograficznie, zwykle przy użyciu kosztownych faz odwróconych (zazwyczaj do wyizolowania saponin o zadowalającej czystości konieczna była wielokrotna chromatografia), czasem dodatkowo krystalizując uzyskane w ten sposób podczyszczone frakcje z rozpuszczalników organicznych - głównie alkoholi. Taki sposób postępowania nie był efektywny, wydajność pozostawała bardzo niska a co za tym idzie nie nadawała się również do wdrożenia technologii w większej skali. Na użytek rozpoczętego projektu opracowano więc znacznie wydajniejszą metodę pozyskiwania protoescygeniny z escyny oraz przeprowadzono jej skalowanie i przekształcenie w proces technologiczny.<sup>100</sup>

Opracowana w Instytucie Farmaceutycznym nowa metoda (Schemat 5.) w początkowych etapach przebiega zgodnie ze wspomnianą wyżej procedurą znaną z literatury.  $\beta$ -Escynę rozpuszczoną w metanolu poddano hydrolizie kwaśnej

metanolem 95% kwasu siarkowego (VI) a następnie hydrolizie zasadowej 30% metanolem 95% wodorotlenku sodu. W ten sposób otrzymano surową mieszaninę sapogenin (głównie protoescygeniny, escygeniny oraz barringtogenoli) oraz wszelkiego rodzaju związków ubocznych powstałych po procesie podwójnej hydrolizy. Według informacji literaturowych i patentowych określających stan techniki taką mieszaninę oczyszczano przez kilkakrotną chromatografię, natomiast wprowadzona przez nas innowacja polegała na całkowitej rezygnacji z metod chromatograficznych. Do mieszaniny sapogenin dodano wodę oraz eter tert-butyłowometylowy (MTBE) w odpowiednim, dobranym eksperymentalnie stosunku i dopiero w takim trójskładnikowym układzie rozdzielono fazy. Z fazy organicznej wytrącono kolejną porcją wodą surowy osad protoescygeniny o czystości ok. 75%. Osad zawierał ponad 10 zanieczyszczeń, w tym barringtogenol C oraz utlenione formy protoescygeniny i barringtogenolu, które można było pogrupować ze względu na ich polarność. Przeprowadzono szereg eksperymentów w poszukiwaniu najlepszych metod krystalizacji, które umożliwiłyby oddzielenie wszystkich niepożądanych związków. W celu usunięcia zanieczyszczeń polarnych przetestowano następujące układy: proste alkohole (metanol, etanol oraz izopropanol), aceton, kwas octowy, DMF, DMSO, N-metylopirolidon, MTBE/metanol – osady wytrącano wodą lub cykloheksanem. Z kolei zanieczyszczenia niepolarne usuwano układami: alkohole proste, aceton – osady wytrącano alkoholami, acetonitrylem oraz węglowodorami (heksanem, cykloheksanem, heptanem). Po analizie otrzymanych wyników surowy osad protoescygeniny poddano dwóm krystalizacjom z układów - izopropanol/woda a następnie izopropanol/cykloheksan, które pozwoliły pozbyć się zanieczyszczeń o mniejszej oraz większej polarności i tym samym uzyskać osad protoescygeniny w postaci monohydratu o czystości HPLC powyżej 98%. Osiągnięcie takiej czystości było wystarczające do przeprowadzenia szczegółowej analityki oraz do dalszych transformacji. Przedstawiony sposób postępowania pozwala uzyskać około 65 g protoescygeniny o wysokiej czystości z każdego kilograma  $\beta$ -escyny. Wydajność ta może wydawać się niska, jednak należy przypomnieć, że zawartość protoescygeniny w mieszaninie sapogenin to jedynie ok. 20 – 30% - wartość ta jest zmienna i zależna od składu handlowej  $\beta$ -escyny.



**Schemat 5.** Stopniowa hydroliza  $\beta$ -escyny (mieszaniny saponin) do mieszaniny sapogenin a następnie izolacja oraz krystalizacja jednego aglikonu - protoescygeniny.

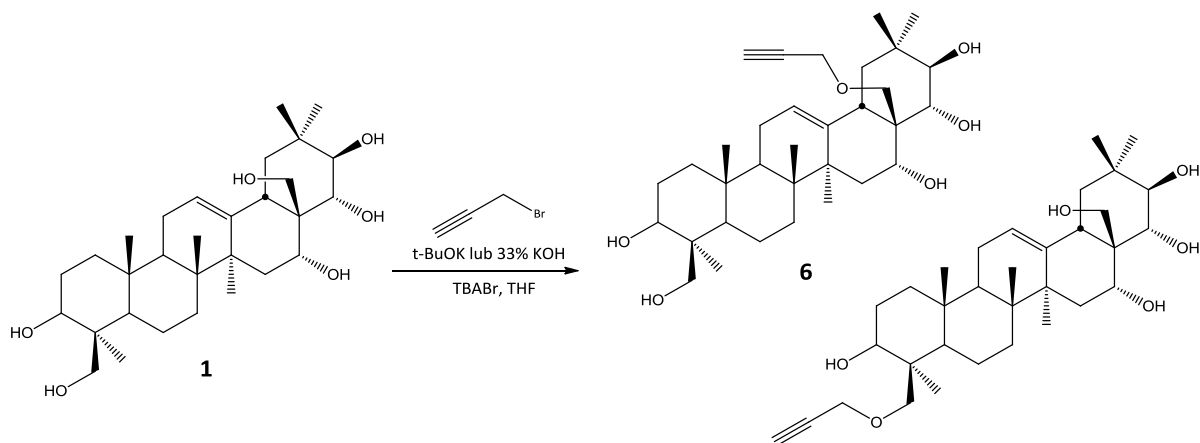
## 3.2 Triazolowe pochodne protoescygeniny

Serie pochodnych, które na potrzeby tej pracy dla uproszczenia nazywane będą triazolami protoescygeniny otrzymano z dwóch powodów. Po pierwsze ich synteza demonstruje sposoby radzenia sobie w praktyce z trudnościami wieloetapowych syntez skomplikowanych cząsteczek, zwłaszcza zawierających kilka grup o podobnej reaktywności. Po drugie przybliżają metodologię „Click Chemistry”, która w przedstawionym wariantcie, ze względu na selektywność i łagodne warunki reakcji, idealnie nadaje się do stosowania w związkach o znacznej komplikacji struktury.<sup>101,102</sup>

### 3.2.1 Etery propargilowe

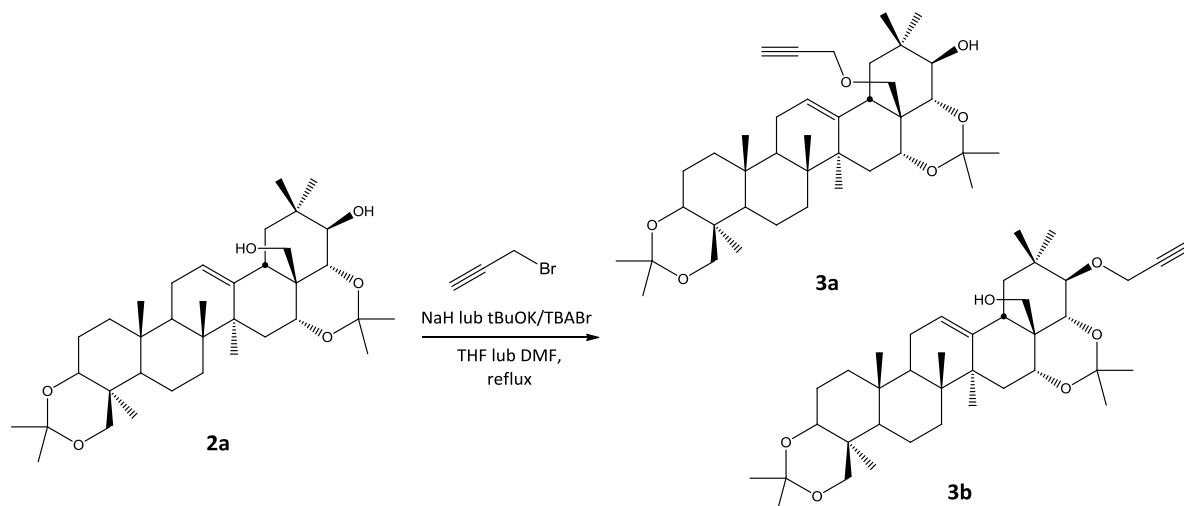
W bezpośrednim alkirowaniu protoescygeniny można spodziewać się dwóch głównych produktów mono-podstawionych na pierwszorzędowych grupach hydroksylowych oraz pochodnej di-podstawionej, nie można ponadto wykluczyć przereagowania hydroksyli drugorzędowych co zwiększa znacząco ilość produktów ubocznych (teoretycznie możliwych jest ponad 60 pochodnych).

Pierwsza próba otrzymania eterów propargilowych w warunkach, gdzie jako zasadę wykorzystano *tert*-butanolan potasu prowadziła do dwóch produktów o współczynniku  $R_F$  na tyle zbliżonym, że nie było możliwe uzyskanie czystości wystarczającej do identyfikacji i potwierdzenia struktury. Jednocześnie reakcja prowadzona w warunkach katalizy przeniesienia fazowego (PTC; 33%  $KOH_{aq}$ , TBABr) w temperaturze pokojowej jak również w obniżonej prowadziła do mieszaniny przynajmniej pięciu związków, rozdzielenie ich okazało się nieskuteczne. Przy sześciu wolnych grupach hydroksylowych przeprowadzenie selektywnej reakcji alkirowania bromkiem propargilu okazuje się mało realne. Pochodną z eterem propargilowym w pozycji C28 (**6**, Schemat 6.) uzyskano w późniejszym czasie inną drogą (podrozdział 3.2.3).



**Schemat 6.** Reakcja propargilowania protoescygeniny. 2 preferowane produkty – podstawione I-rzędowe grupy hydroksylowe.

W związku z powyższym, wprowadzenie eteru propargilowego do struktury trójterpenu przeprowadzono z wykorzystaniem bardziej korzystnego substratu jakim jest 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenprotoescygenina (**2a**, Schemat 7., patrz też podrozdział 3.3.1.1). Ze względu na obecność zabezpieczeń w postaci acetalu należało na nowo przetestować metody alkilowania. Reakcję prowadzono początkowo w warunkach bezwodnych używając NaH, *t*BuOK oraz rozdrobnione KOH w THF lub DMF. W DMF-ie reakcja nie zachodzi, w THF-ie przebiega z wyczerpaniem substratu zarówno wobec KOH, *t*BuOK jak i NaH. Eksperymenty wskazały, że kluczowym etapem w tej reakcji jest wytworzenie alkoholanu (konieczne długotrwałe ogrzewanie substratu z zasadą), a dopiero w drugim kroku dodanie bromku propargilu. Z tego punktu widzenia zastosowanie warunków PTC okazało się dużo bardziej skuteczne. Czas reakcji skrócił się z kilku godzin ogrzewania w temperaturze wrzenia do maksymalnie 2-3 godzin mieszania w temperaturze pokojowej, ponadto wyeliminowano konieczność utrzymania bezwodnych warunków.



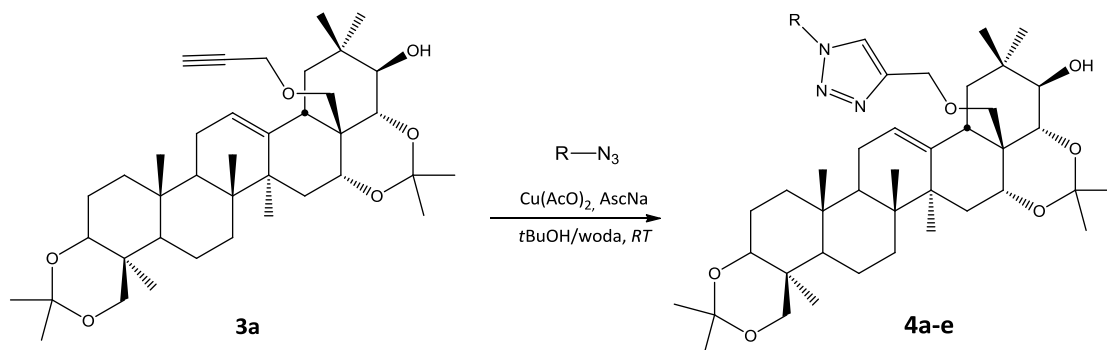
**Schemat 7.** Reakcja propargilowania 3,24;16,22-di-O,O-izopropylidenoproteoscygeniny (dwa wyizolowane produkty).

Niezależnie od metody w reakcji otrzymano dwa produkty o bardzo zbliżonej polarności. Rozdział chromatograficzny zoptymalizowano na tyle, by móc otrzymywać główny produkt podstawiony w pozycji C28 (**3a**) z czystością wahającą się w granicach 85-99%. Dodatkowo izolowano regioizomer podstawiony w pozycji C21 (**3b**) z gorszą czystością, jego ilości były kilkukrotnie mniejsze dlatego tego regioizomeru nie wykorzystano do dalszych modyfikacji. W późniejszym czasie udało się znaleźć dużo łatwiejszą i wydajniejszą metodę oczyszczania pochodnej **3a** przez prostą krystalizację z metanolu. Surowy osad rozpuszczono w metanolu w podwyższonej temperaturze po czym, podczas powrotu do temperatury otoczenia, wypada ponownie osad pochodnej **3a** o czystości powyżej 90% z zawartością pochodnej **3b** nie przekraczającą 3%.

### 3.2.2 Reakcja dipolarnej 1,3-cykloaddycji Huisgena

Po otrzymaniu pochodnej zawierającej terminalne wiązanie potrójne - 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloproteoscygeniny (**3a**) – stało się możliwe przyłączenie związków zawierających grupę azydkową w reakcji dipolarnej 1,3-cykloaddycji Huisgena, w wyniku której powstaje heterocykliczny układ 1,2,3-triazolu (Schemat 8.). Reakcje zachodzące według tego mechanizmu występują w kilku wariantach różniących się układem rozpuszczalników i/lub użytym katalizatorem. Wybrany wariant tej

reakcji wobec katalizatora miedziowego przebiega w łagodnych warunkach dając tylko jeden regioizomer z dwóch możliwych powstających w warunkach termicznych. Spełnione więc zostają wymagania stawiane metodologii „Click Chemistry” umożliwiając otrzymywanie w stosunkowo prosty sposób większej ilości pochodnych.<sup>103-106</sup>

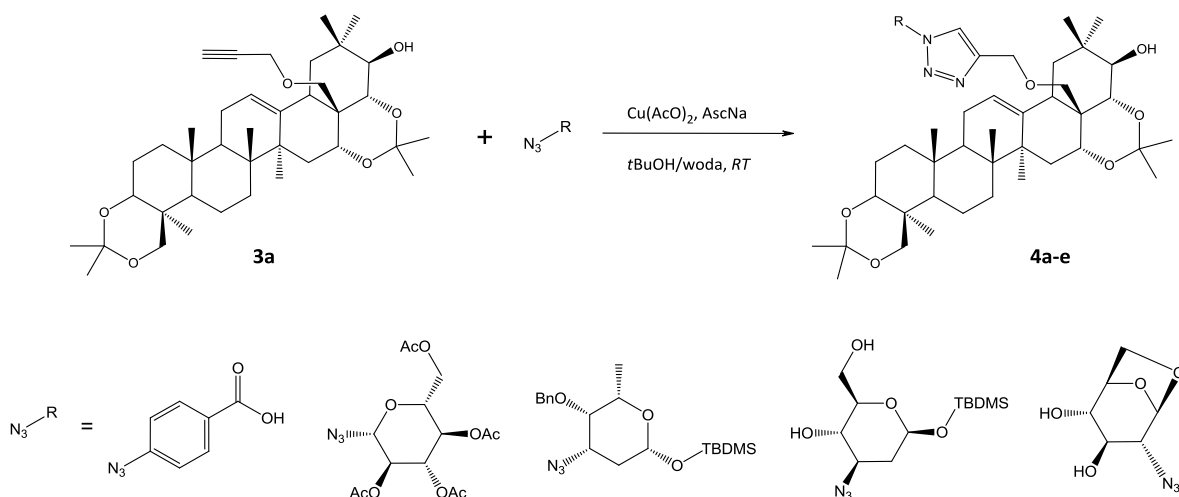


**Schemat 8.** Ogólny zapis reakcji dipolarnej 1,3-cykloadycji Huisgena 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-protoescygeniny.

W pierwszych próbnych reakcjach zastosowano mieszaninę rozpuszczalników *t*BuOH/woda wobec octanu miedzi(II) ( $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ) oraz askorbinianu sodu (AscNa). W takich warunkach jony  $\text{Cu}^{1+}$  powstają *in situ* gwarantując postęp reakcji i uniezależniając metodę od jakości soli miedzi (I). Pierwsze doświadczenia pokazały, że oba reagenty należy dodawać do reakcji w postaci świeżo przygotowanych roztworów, a wtedy reakcja przebiega szybko i z wyczerpaniem substratu.

### 3.2.2.1 Azydki aromatyczne i sacharydowe

Opisaną powyżej procedurę zastosowano do otrzymania szeregu pochodnych triazolowych w reakcji 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescygeniny z odpowiednimi azydkami, którymi był kwas 4-azydobenzoesowy oraz azydocukry z częściowo zabezpieczonymi grupami hydroksylowymi m.in. grupami acetylowymi (Ac) lub tert-butyldimetylosililowymi (TBDMS)(Schemat 9.).



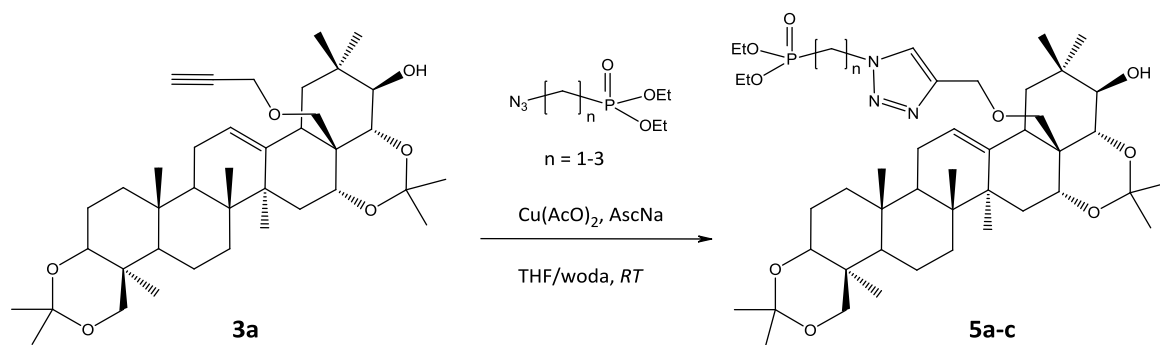
**Schemat 9.** Metoda „Click Chemistry” w otrzymywaniu połączenia triazolowego między zabezpieczonym aglikonem a zabezpieczonymi azydki.

W zależności od przyłączanego azydku obserwowano nieco odmienne barwy mieszanin reakcyjnych gdy reakcja dobiegnie do końca. Mieszanina o błękitnej barwie pochodzącej od roztworu soli  $\text{Cu}^{2+}$  brązowieje na krótki czas pod wpływem czynnika redukującego (powstawanie jonów  $\text{Cu}^{1+}$ ), aby po chwili zmętnieć. Następnie katalizator ulega zużyciu, co obserwowano jako zanik zmętnienia i pojawienie zielonej lub brązowej barwy klarownej mieszaniny. Po izolacji i chromatografii kolumnowej uzyskano pochodne, których czystość zawierała się w przedziale 90 - 99%. Sumaryczne wydajności zwykle nie przekraczały 50% ponieważ sam proces oczyszczania chromatograficznego, z racji na dużą ilość zanieczyszczeń obecnych w surowych osadach, powoduje duże straty. Struktury triazoli od **4a** do **4e** potwierdzono za pomocą odpowiednich analiz NMR i MS.

### 3.2.2.2 Azydki alkilofosfoniowe

Analogicznie do serii triazoli **4a-e** otrzymano pochodne triazolowe w reakcji 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescygeniny z trzema azydki estru dietylowego kwasu fosforowego (Schemat 10.), różniących się długością łańcucha alifatycznego łączącego atom fosforu z grupą azydkową (azydki alkilofosfoniowe pozyskane dzięki uprzejmości Pani dr n. farm. Iwone E. Głowackiej z Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi).





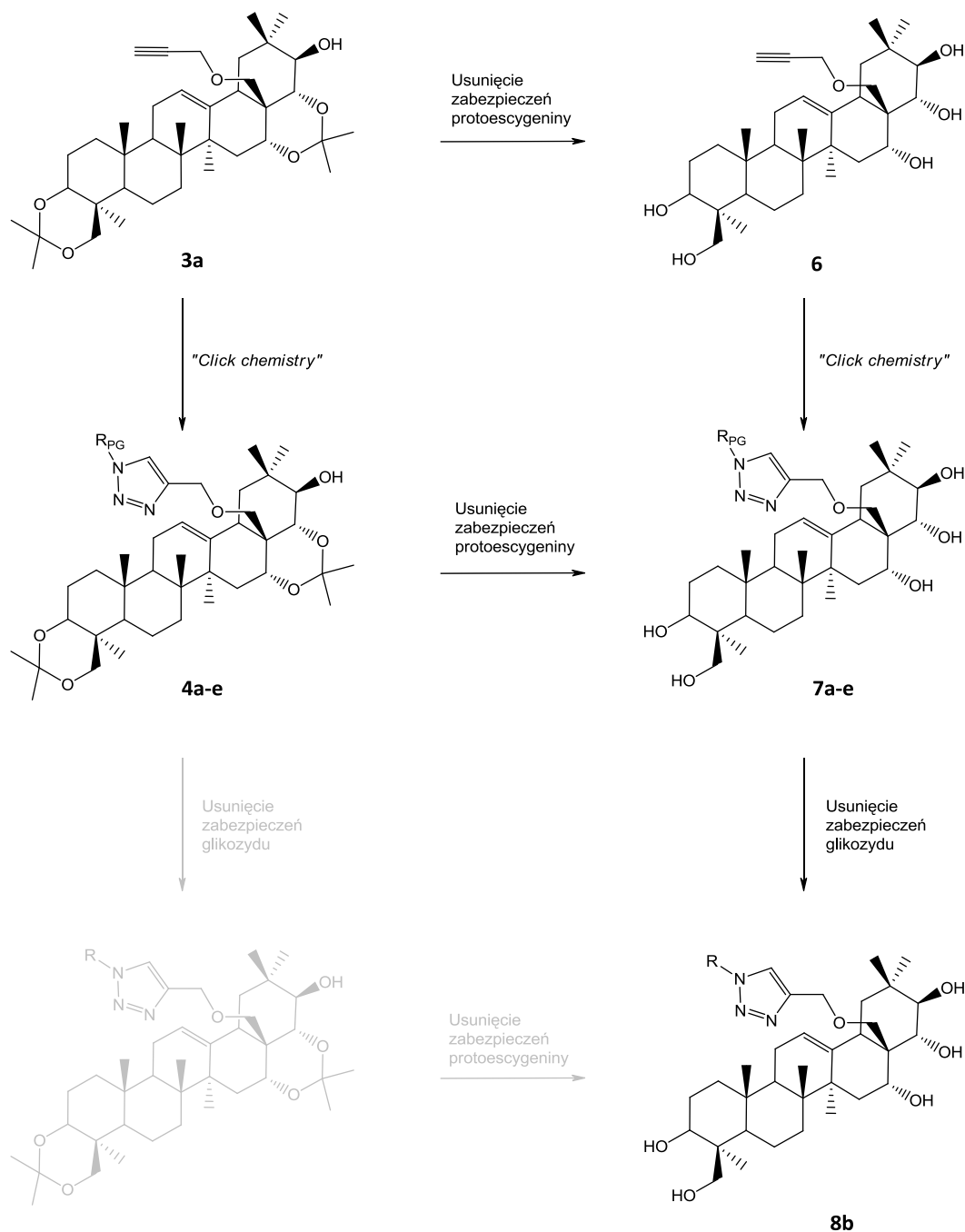
**Schemat 10.** Metoda „Click Chemistry” w otrzymywaniu połączenia triazolowego między zabezpieczonym aglikonem a estrami etylowymi azydku fosforowego.

W zależności od przyłączanego azydku barwy mieszaniny reakcyjnej gdy reakcja dobiegnie do końca zauważalnie się różniły, tak samo jak to miało miejsce w serii triazoli cukrowych. Po izolacji i chromatografii kolumnowej uzyskano pochodne z wydajnością ok. 50%, których czystość umożliwiała potwierdzenie ich struktury za pomocą odpowiednich analiz NMR i MS. Pozornie niewielkie różnice w strukturze trzech pochodnych **5a-c** (1, 2 lub 3 atomy węgla w łańcuchu obecnym w azydku) są dobrze widoczne zwłaszcza w fosforowych widmach NMR, w których przesunięcia fosforu bardzo wyraźnie rosną w miarę wydłużania się łańcucha alkilowego (od 12,756, przez 22,446 do 26,946 ppm).

### 3.2.3 Selektywne usunięcie grup zabezpieczających

Ostatnim krokiem było usunięcie grup zabezpieczających z zsyntezowanych pochodnych triazolowych. Odmienny charakter chemiczny przyłączonych grup powodował, że wymagane było zastosowanie różnych warunków. W ten sposób, przez selektywne usuwanie konkretnych grup, możliwe jest otrzymanie pochodnych na różnym stopniu zabezpieczenia. Analizując schemat (Schemat 11.) warto zwrócić uwagę, że część odbezpieczonych pochodnych można otrzymać także w reakcji cykloaddycji z 28-propargiloproteoescygeniną (**6**) otrzymaną przez usunięcie grup izopropylidenowych. Sprawdzając możliwości selektywnej deprotekcji tak złożonych związków otrzymano pochodne z wolnymi grupami hydroksylowymi protoescygeniny oraz pochodną z wolnymi grupami hydroksylowymi protoescygeniny oraz glikozydu. Eksperymenty wykazały, że w tym układzie nie jest możliwe uzyskanie pochodnych z wolnymi grupami glikozydu

przy jednoczesnym utrzymaniu zabezpieczeń izopropylidenowych na hydroksylach protoescygeniny.

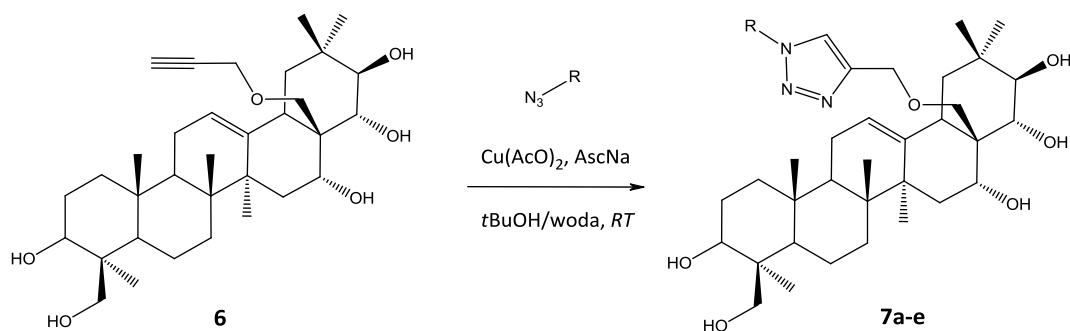


**Schemat 11.** Alternatywne ścieżki otrzymywania triazoli o różnym stopniu zabezpieczenia.

Realizując jedną z możliwych strategii, w początkowych eksperymentach zdecydowano się otrzymać 28-O-propargilprotoescygeninę (**6**), by dalej użyć jej w reakcjach z azydami. Usunięcie grup izopropylidenowych zachodzi w mieszaninie

chloroformu z metanolem (transketalizacja) przy udziale katalitycznych ilości kwasu p-toluenosulfonowego (pTSA). Reakcja zachodzi w ciągu 3 godzin prowadząc do niemal całkowitego wyczerpania substratu i powstania jednego głównego produktu (dodatkowo dwa zanieczyszczenia). Rozdział chromatograficzny nie jest skomplikowany, zapewnia wysoką wydajność ok. 95% oraz wysoką czystość na poziomie 98%. Przeprowadzono eksperyment, w którym usunięcie acetalu następuje bezpośrednio po reakcji propargilowania **2a** w jednym naczyniu reakcyjnym, bez etapu oczyszczania produktu pośredniego. Taka procedura była mniej wydajna, a czystość znacznie niższa (na TLC widać szereg zanieczyszczeń).

Dysponując 28-propargiloprotoescygeniną (**6**) wykonano szereg reakcji cykloaddycji (Schemat 12.).

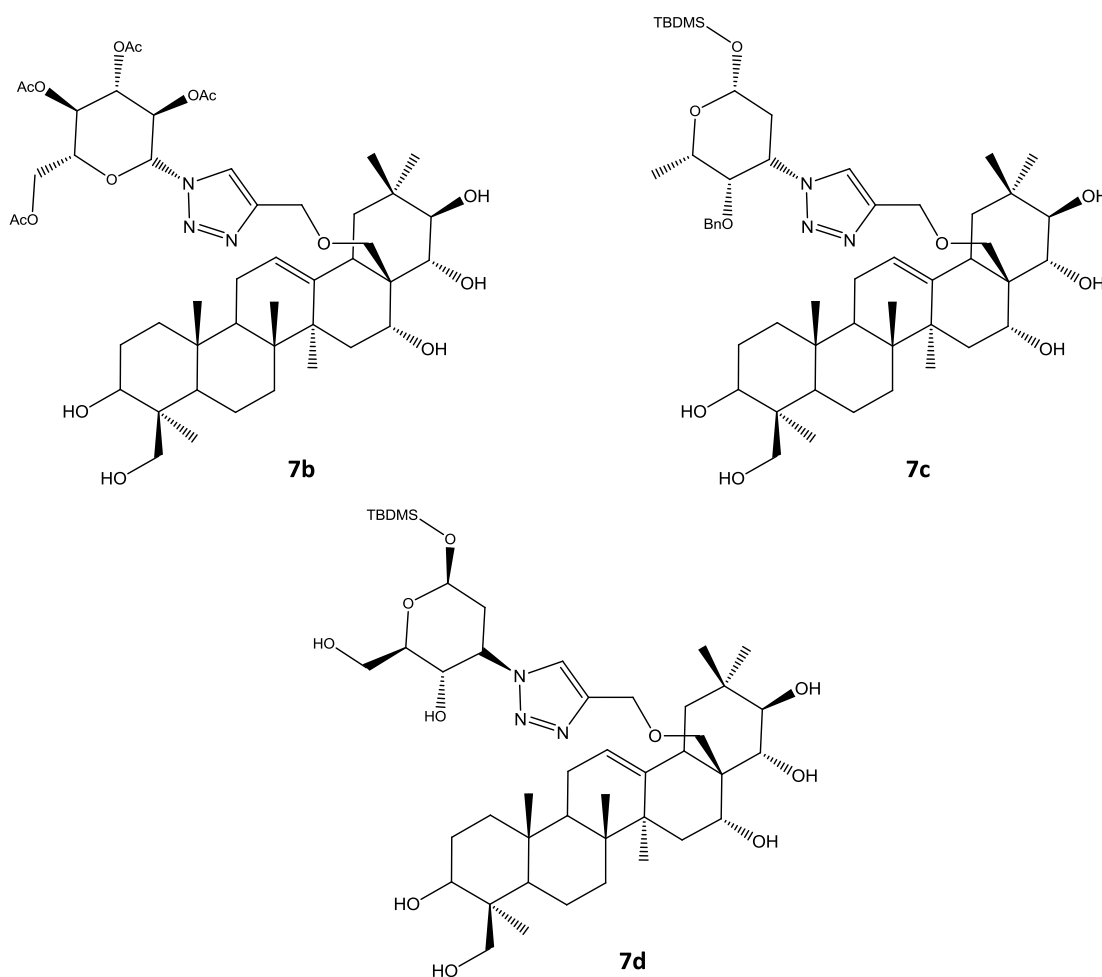


**Schemat 12.** Reakcja dipolarnej 1,3-cykloaddycji Huisgena – triazole z wolnymi grupami aglikonu.

W wyniku takiego postępowania otrzymano analogiczną do poprzedniej serię pięciu związków (**7a-e**). Reakcje prowadzono w warunkach jak poprzednio, zachowując tą samą proporcję rozpuszczalników i reagentów. Wizualny przebieg reakcji nie różnił się znacząco od obserwacji poczynionych dla serii **4a-e**. Wszystkie surowe produkty udało się wyizolować chromatograficznie uzyskując wysoką, bo przekraczającą 90% czystość. Struktury otrzymanych związków zostały potwierdzone.

W kolejnym kroku dla pochodnych zawierających fragmenty cukrowe zabezpieczone grupami acetylowymi lub silylowymi (**7b-d**, Rys. 9.) wykonano reakcje odbezpieczania. Grupy acetylowe poddano solwolizie metanolanem sodu w MeOH, natomiast zabezpieczenia silylowe usunięto stosując 1M roztwór fluorku tetrabutylamonowego (TBAF) w THF-ie. Zastosowanie hydratu TBAF $\times$ 3H<sub>2</sub>O jako donora jonów fluorkowych dało negatywny wynik hydrolizy grup silylowych. Otrzymane surowe

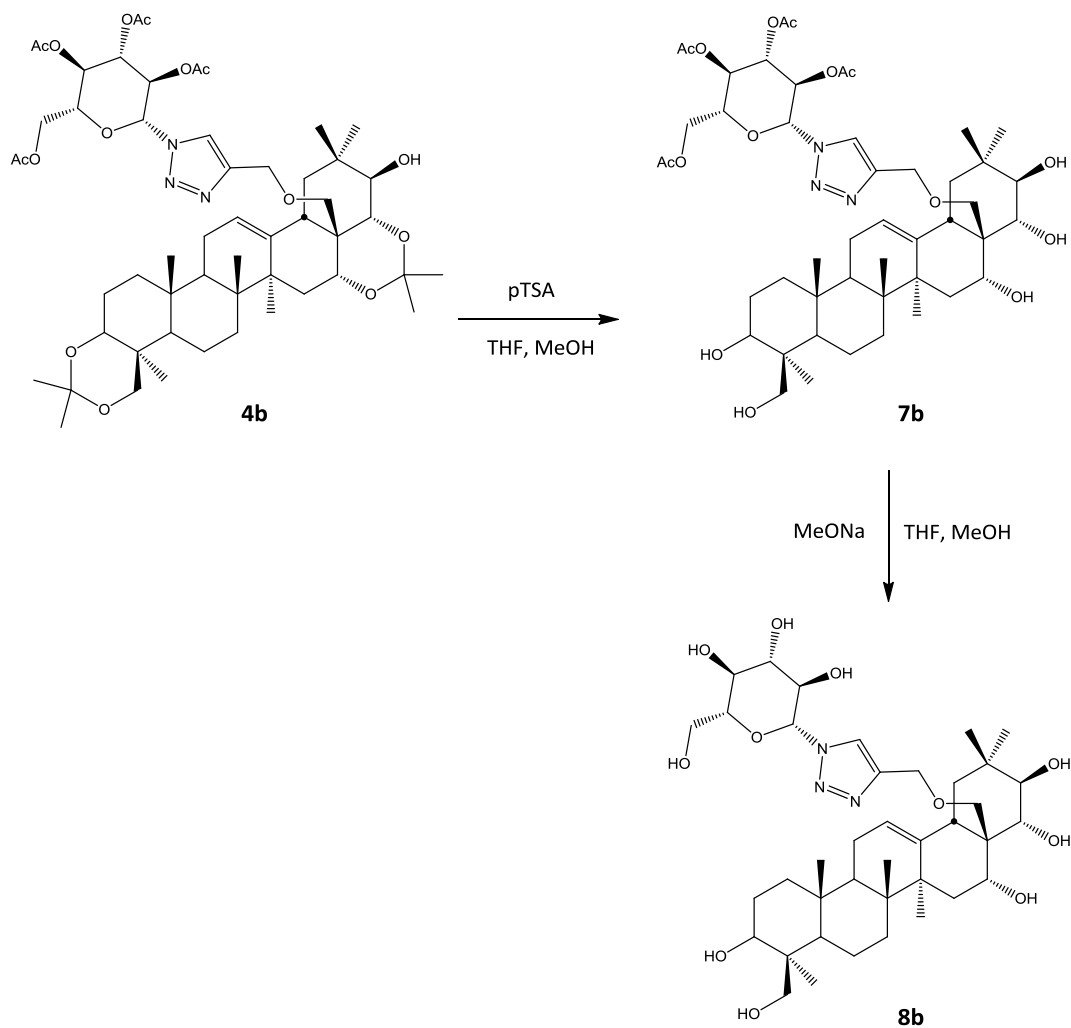
związki próbowano oczyszczać metodami chromatografii kolumnowej, analogiczny jak w poprzednich seriach, jednak polarność tych pochodnych jest już na tyle wysoka, że znacznie utrudnia rozdział na fazach normalnych. Ponadto poziom zanieczyszczeń jest wysoki a ich współczynniki  $R_f$  są bardzo bliskie produktom. Próby oczyszczenia metodą preparatywnej chromatografii HPLC również nie przyniosło zadowalających rezultatów.



**Rys. 9.** Struktury triazoli, które poddano reakcjom zdjęcia grup zabezpieczających części cukrowych.

Wobec problemów z oczyszczaniem pochodnych z serii **7b-d** związki te wytwarzano alternatywną drogą - modyfikując odpowiednie w pełni zabezpieczone pochodne z serii **4b-d**. Izopropylidenowe zabezpieczenia zhydrolizowano katalizując reakcję pTSA, a następnie usunięto zabezpieczenia grup hydroksylowych fragmentów glikozydowych. Izolacja chromatograficzna w tym wariantcie była łatwiejsza ze względu na zdecydowanie mniejszą ilość zanieczyszczeń, otrzymano czystą pochodną z całkowicie odbezpieczoną

częścią cukrową 1-azydo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo- $\beta$ -D-glukopiranozy (**8b**), dla której możliwe było potwierdzenie struktury (Schemat 13.).

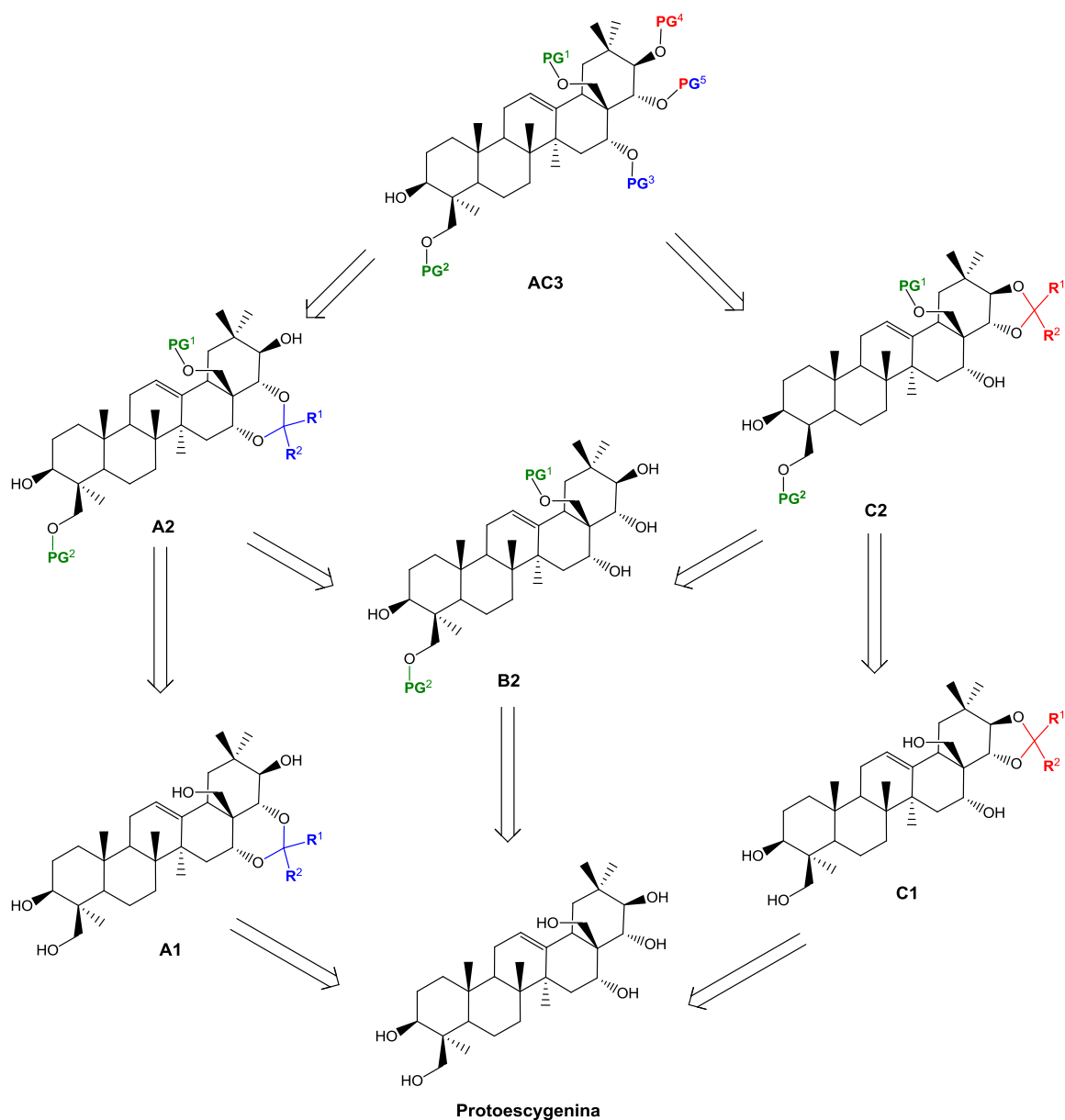


**Schemat 13.** Usunięcie grup zabezpieczających z aglikonu oraz części cukrowej.

W dwóch pozostałych reakcjach, czyli odbezpieczania pochodnych z 3-azydo-1-O-tertbutyldimetylosililo-4-O-benzylo-2,3,6-trideoksy- $\beta$ -L-lykso-heksapiranozą (**8c**) oraz 3-azydo-1-O-tertbutyldimetylosililo-2,3-dideoksy- $\beta$ -D-arabino-heksopiranozą (**8d**) doszło do rozkładu produktu – analiza NMR i MS sugeruje, że nastąpiła utrata części cukrowej natomiast przy aglikonie pozostał nienaruszony pierścień triazolowy.

### 3.3 W jaki sposób naśladować naturę, czyli mimetyki escyny.

Jak wspomniano już we Wstępie jednym z celów pracy było doświadczalne sprawdzenie możliwości uzyskania pochodnej możliwie wiernie naśladowującej pod względem strukturalnym naturalnie występujące saponiny. Najogólniej polega to na podłączeniu elementu sacharydowego do grupy hydroksylowej w położeniu C3 oraz niewielkiego elementu alifatycznego w pozycję C21 i/lub C22 (Rys. 6.). Do tak obranego celu może prowadzić kilka dróg syntezy. W każdej z nich dąży się przejściowo do pochodnej, która posiadać będzie wolną grupę hydroksylową C3 przy jednoczesnym tymczasowym zablokowaniu pozostałych pięciu. Dobrze byłoby, gdyby zabezpieczenia te miały różny charakter chemiczny, co pozwoli na późniejsze ich odbezpieczenie w sposób selektywny. Po dołączeniu elementu cukrowego istniałaby więc możliwość usunięcia konkretnej blokady i otrzymania pożądanego pochodnej zbliżonej strukturą do naturalnego pierwowzoru. Na schemacie (Schemat 14.) w postaci analizy retrosyntetycznej przedstawiono teoretycznie możliwe drogi prowadzące do pożądanego układu.



**Schemat 14.** Wariantowa analiza retrosyntetyczna związku z wolną grupą hydroksylową C3.

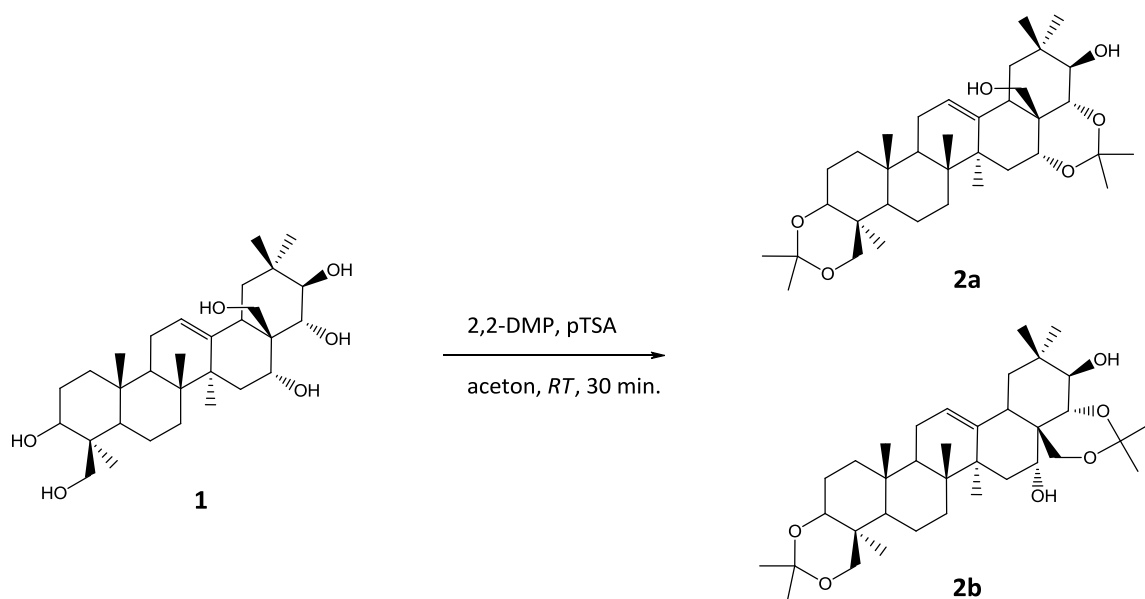
### 3.3.1 Ścieżka 1. – przez *O,O*-diizopropylidenoprotoscygeninę

#### 3.3.1.1 Ketalizacja protoscygeniny

Ze względu na strukturę cząsteczki protoscygeniny, w której grupy hydroksylowe położone są blisko siebie w przestrzeni, korzystne wydaje się wykorzystanie cyklicznych acetalu do ich zablokowania. Tworząc pierścień np. izopropylidenowy zabezpieczeniu ulegają przynajmniej dwa hydroksyle, układ protoscygeniny pozwala bowiem na więcej

takich podstawień jednocześnie. Za najlepsze do planowanej transformacji uznano ketale acetonu, których skomplikowanie jest najmniejsze, przez co nie wprowadzają dodatkowego centrum asymetrii oraz nie stanowią dużej zawady sterycznej.

W reakcji protoescygeniny z 2,2-dimetoksypropanem (2,2-DMP) w acetonie wobec katalitycznych ilości pTSA otrzymano skomplikowaną mieszaninę złożoną z kilku lub nawet kilkunastu produktów, co świadczy o powstaniu nie tylko pożądaných acetonidów protoescygeniny ale i najpewniej hemiacetali w różnej konfiguracji (Schemat 15.).



**Schemat 15.** Reakcja acetonidowania protoescygeniny (dwie wyizolowane pochodne).

Z mieszaniny produktów wyizolowano chromatograficznie dwa związki o czystości umożliwiającej analizę NMR i MS, na podstawie których określono struktury 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenprotoescygeniny (**2a**) oraz 3,24;22,28-O,O-diizopropylidenprotoescygeniny (**2b**). Rozdział chromatograficzny mieszaniny komplikuje ilość produktów oraz ich bliskie współczynniki  $R_f$ . Z tego powodu otrzymywanie w ten sposób któregośkolwiek z nich w większych ilościach byłoby pracochłonne, a wydajność niewspółmierna do włożonej pracy. Zaobserwowano jednak, że produkt bardziej pożądaný tj. 3,24;16,22-di-O,O-izopropylidenprotoescygenina (**2a**), będący prekursorem syntonu **A1** (Schemat 14.), wytrącał się z mieszaniny reakcyjnej w postaci osadu o zadowalającej czystości. Napotkano na problem niestabilności powstałego związku, który po ponownym rozpuszczeniu dysproporcjonował do mieszaniny acetonidów lub ulegał degradacji do



protoescygeniny, co było związane z obecnością śladowych ilości pTSA. Przed odsączeniem wytrąconego osadu zawieszinę reakcyjną macerowano z dodatkiem niewielkiej ilości trietyloaminy co rozwiązało problem nieprzereagowanego kwasu i późniejszej stabilności produktu.

Początkowo stosowano z góry ustalone proporcje acetonu i 2,2-DMP w stosunku do protoescygeniny, a reakcję prowadzono w podwyższonej temperaturze (ok. 55°C), pozostawiając następnie do wystygnięcia do *RT* i wytrącenia całości osadu. W toku optymalizacji próbowano obniżyć zużycie rozpuszczalników i wyeliminować konieczność ogrzewania reakcji. Początkowo prowadzone reakcje wykazywały niską powtarzalność w czystości i/lub wydajności. Ustalono, że do postępu reakcji i otrzymania osadu nie jest konieczne ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej. W szeregu kolejnych eksperymentów ulegały zmianie proporcje acetonu i 2,2-DMP do substratu. Ostatecznie zmniejszenie ekwiwalentów dla acetonu oraz 2,2-DMP doprowadziło do uzyskania powtarzalności w wytrącaniu osadu z mieszaniny reakcyjnej. Osiągnięto wydajności powyżej 80% i czystość powyżej 90%.

Uzyskiwany według tej metody surowy osad charakteryzował się zwykle czystością HPLC na poziomie 94-96%. Czystość taka w większości przypadków była wystarczająca do celów syntetycznych. Gdyby jednak wymagana była wysoka czystość produktu (>99%) lub surowy osad z reakcji odznaczałby się niższą czystością niż standardowo otrzymywany, możliwe jest poprawienie czystości związku **2a**. Po sprawdzeniu różnych sposobów krystalizacji i maceracji surowej 3,24;16,22-di-O,O-izopropylidenoproteoescygeniny (**2a**) okazało się, że jako metoda oczyszczania najlepsza jest maceracja w eterze *tert*-butyłowometylowym (MTBE). Procedura ta umożliwia usunięcie jednocześnie obu rodzajów zanieczyszczeń (mniej i bardziej polarnych od produktu głównego) obecnych w osadzie, przy jej pomocy osiągnięto wysoką czystość (99,3%) i wydajność (91,9%).

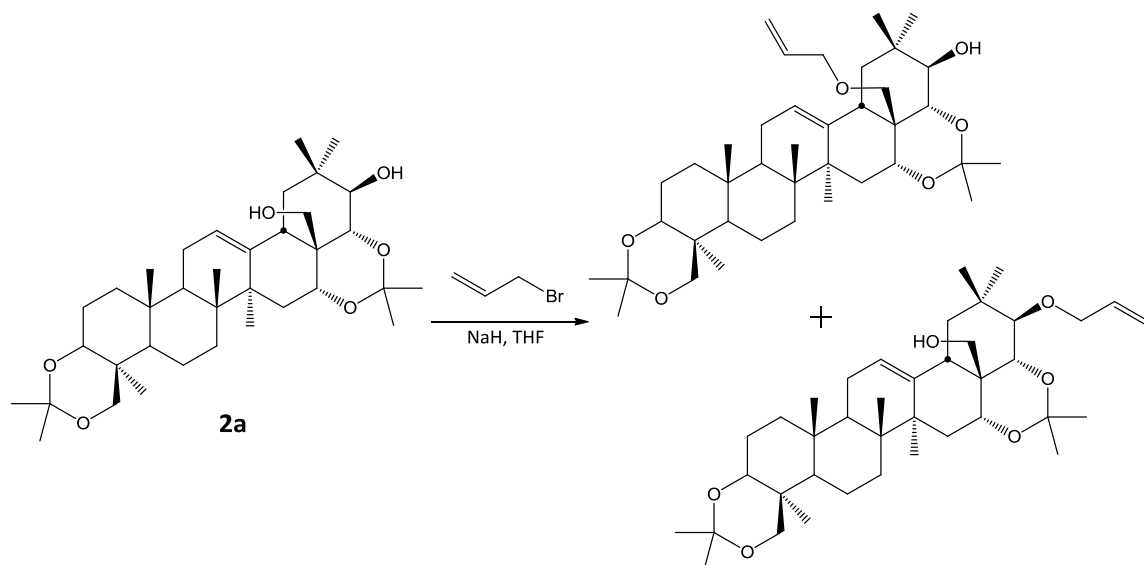
Jako uzupełnienie wykonano również eksperymenty stosując tylko jeden reagent: aceton lub 2,2-DMP. W przypadku reakcji prowadzonej w samym acetonie obserwowano jedynie nieznaczny postęp reakcji w czasie. Dodatek pTSA do zawiesiny nie powodował zauważalnej zmiany stopnia przereagowania. Dodanie jednego ekwiwalentu 2,2-DMP natychmiast inicjowało reakcję, otrzymano produkt z wydajnością 94% i czystością HPLC

91%, zatem użycie 2,2-DMP jest konieczne. Z drugiej strony użycie samego 2,2-DMP prowadziło do podobnej wydajności (92%) przy czystości HPLC wyższej, bo aż 97%. Ze względu na technologiczny charakter tej części badań stosowanie samego 2,2-DMP (jako rozpuszczalnika i reagenta) byłoby nieekonomiczne, dlatego powrócono do metody z mieszaniną 2,2-DMP/aceton.

### *3.3.1.2 Zabezpieczenie grupy hydroksylowej w pozycji C28*

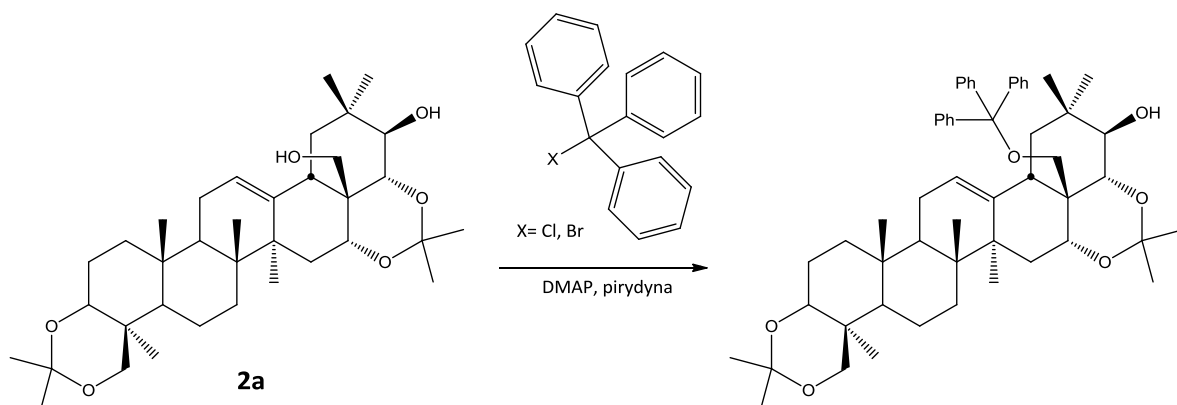
W otrzymanej 3,24;22,28-di-O,O-izopropylidenoproteoscygeninie (**2a**) wolne pozostały dwie grupy hydroksylowe – II-rzędowa w pozycji C21 oraz I-rzędowa w pozycji C28. W reakcjach wymiany protonu preferowaną jest grupa I-rzędowa (ze względu na rzędowość ale także przestrzenne położenie w cząsteczce), jednak należało liczyć się z prawdopodobieństwem powstawania mieszanin monopochodnych, a także dipochodnej. Do eksperymentów sprawdzających możliwości wprowadzenia zabezpieczenia wykorzystano następujące związki: bromek alilu, halogenki trytylu, chlorki silylowe oraz halogenki benzylu (niepodstawiony oraz podstawiony).

Zablokowanie grupy hydroksylowej eterem allilowym (Schemat 16.) stanowiłoby dobre zabezpieczenie ze względu na jego dużą odporność w szerokim zakresie wartości pH (pH = 1 do 12) jak również odporność na wiele powszechnie stosowanych odczynników utleniających i redukujących. Otrzymywanie eteru allilowego z **2a** poprzedzono wykonaniem szeregu reakcji pilotowych dobierając najlepszą zasadę i rozpuszczalnik. Najbardziej obiecujący wynik obserwowano dla wodoroku sodu w THF, zarówno pod względem stopnia przereagowania substratu jak i najniższego poziomu zanieczyszczeń (TLC). Po sprawdzeniu różnych układów chromatograficznych okazało się, że plamka domniemanego produktu zawierała dwa związki (w stosunku ok. 3:1) o niemal identycznym współczynniku  $R_f$ . Rozdział metodami chromatograficznymi nie przyniósł zadowalających rezultatów, a czystość uzyskanych frakcji nie była wystarczająco wysoka, by umożliwić potwierdzenie struktury otrzymanych pochodnych.



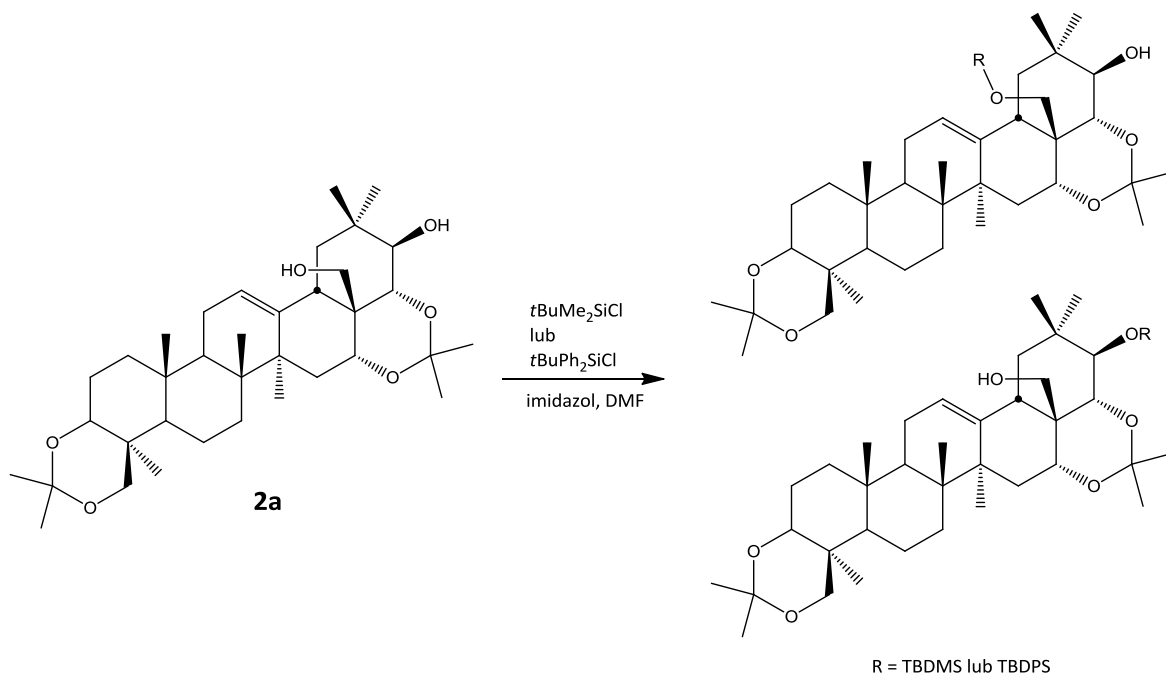
**Schemat 16.** Wprowadzenie eteru allilowego do protoescygeniny (dwa przewidywane produkty).

Próby otrzymania eterów w reakcji z chlorkiem i bromkiem trytylu (Schemat 17.) prowadziły do mieszanin zawierających kilka produktów przy jednoczesnym małym stopniu przereagowania substratu. Dodatek dużego nadmiaru czynnika trytylującego zmniejsza ilość obserwowanych na TLC produktów. Otrzymane mieszaniny próbowano oczyszczać chromatograficznie, jednak pochodne okazały się nietrwałe i wrażliwe na kontakt ze złożem stanowiącym wypełnienie kolumny. Długi czas operacji chromatograficznego wyodrębniania czystych pochodnych powodował ich degradację. Dodatek zasady ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) do eluenta korzystnie ograniczał rozkład związków w czasie chromatografii kolumnowej, jednak nie na tyle, aby pozwolić na wyodrębnienie czystych pochodnych. Nie udało się również uzyskać czystych produktów trytylowowania w procesie krystalizacji, gdzie również obserwowano proces degradacji.



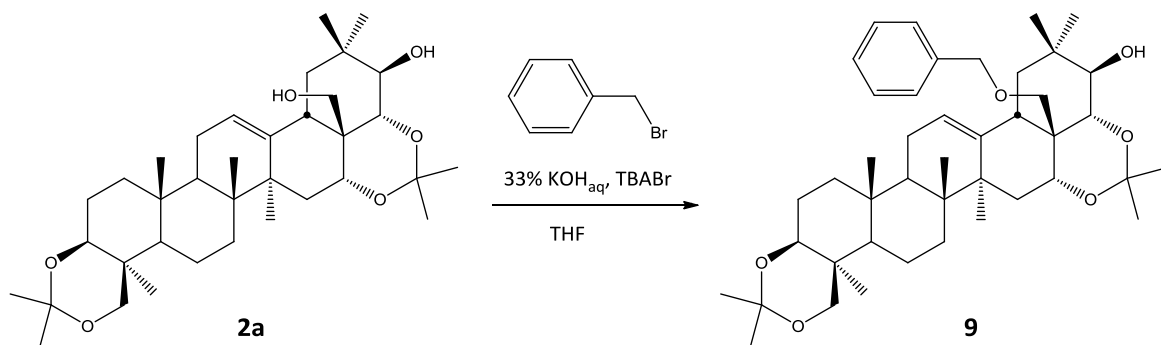
**Schemat 17.** Reakcja zabezpieczenia pozycji C28 eterem trytylowym.

Reakcje wprowadzania grup siliowych prowadzono w standardowych warunkach czyli z udziałem imidazolu, pirydyny lub DBU jako zasad, w takich rozpuszczalnikach jak DMF, THF lub chlorek metylenu (Schemat 18.). Ponieważ układ imidazol/DMF wykazał się skutecznością przy przeprowadzanych wcześniej eksperymentach wprowadzania ugrupowań siliowych do protoescygeniny (podrozdział 3.3.2.1), dlatego w pierwszej kolejności wypróbowano taki właśnie układ. Zastosowanie chlorku *tert*-butyldimetylosililowego (TBDMSCl) dawało w efekcie mieszaninę 2-3 głównych produktów, których separacja od znacznej liczby innych zanieczyszczeń była niemożliwa. Znacznie lepiej pod tym względem sprawdził się chlorek *tert*-butyldifenylosililowy (TBDPSCI), jednak dokładniejsza analiza HPLC frakcji chromatograficznych wykazała obecność dwóch produktów o niemal identycznej polarności (najpewniej dwa produkty monopodstawione). Pomimo takiego wyniku zdecydowano się na próbną reakcję następczą polegającą na alkirowaniu mieszaniny dwóch produktów, licząc na większe zróżnicowanie polarności uzyskanych w ten sposób pochodnych. W reakcjach alkirowania pozycji C21 oraz C28 zastosowano chlorki propargilowe lub benzylowe. Te eksperymenty zakończyły się jednak degradacją eteru siliowego w zastosowanych zasadowych warunkach alkirowania.



**Schemat 18.** Reakcja zabezpieczenia pozycji C28 eterami siliłowymi (TBDMS i TBDPS).

Niepowodzenia z powyższymi grupami ochronnymi skierowały eksperymenty ku eterom benzyłowemu. Są to zabezpieczenia o wysokiej odporności i specyficznych metodach usuwania. Ponadto struktura używanych do tego celu halogenków benzyłu, w których pierścień benzyłowy może być podstawiony w różny sposób, daje możliwość szerokiej regulacji aktywności a przez to większej selektywności niż miało to miejsce w przypadku bromku allylu czy chlorków siliłowych. Sugerując się informacjami literaturowymi sprawdzono cztery halogenki benzyłowe: bromek p-nitrobenzyłowy, bromek p-bromobenzyłowy, chlorek p-metoksybenzyłowy oraz niepodstawiony bromek benzyłu. Spośród sprawdzonych metod najlepsze wyniki pod względem czasu reakcji, czystości oraz stopnia przereagowania osiągnięto w warunkach PTC (33%  $\text{KOH}_{\text{aq}}$ , THF lub  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) dla niepodstawionego bromku benzyłu otrzymując 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-benzyloprotoescygeninę (**9**, Schemat 19.).



**Schemat 19.** Reakcja zabezpieczenia pozycji C28 eterem benzylovym.

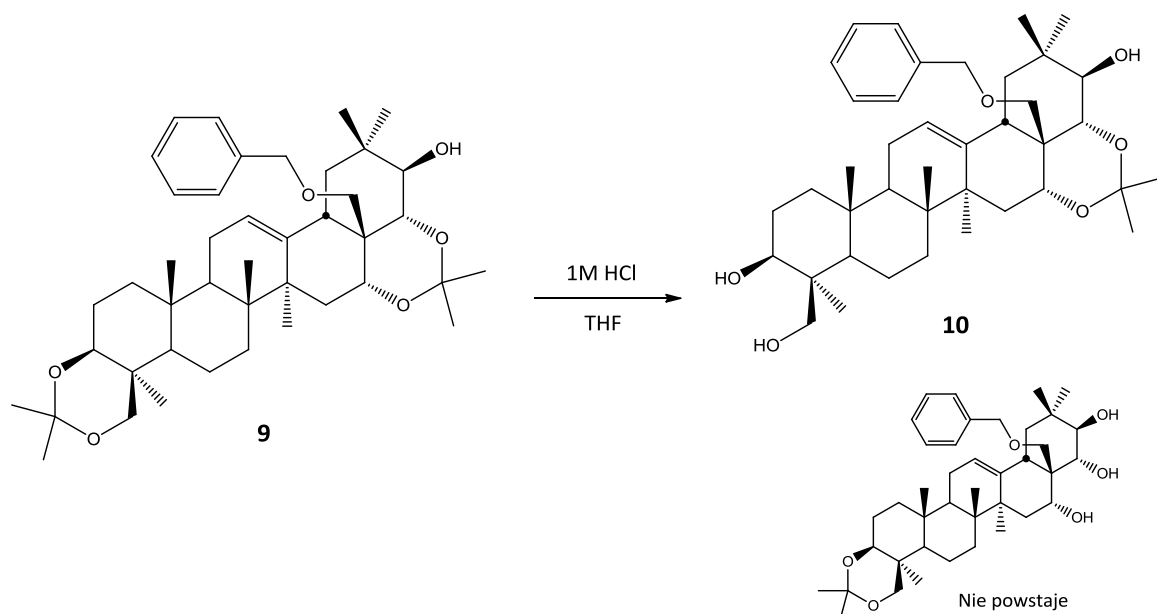
Podstawione halogenki benzylu reagują w tym samych warunkach z wyczerpaniem substratu, jednak otrzymuje się mieszaniny wyraźnie bardziej skomplikowane. W eteryfikacji bromkiem p-nitrobenzylowym i p-bromobenzylowym powstają mieszaniny produktów o bardzo małej różnicy polarności, których nie udało się rozseparować metodami chromatograficznymi i potwierdzić ich struktury. Z kolei chlorek p-metoksybenzylowy w silnie zasadowych warunkach reakcji ulega częściowym degradacjom lub reakcjom pobocznym. W reakcji powstaje pewna ilość głównego produktu, jednak duża ilość zanieczyszczeń nie pozwoliła na uzyskanie frakcji o zadowalającej czystości.

### 3.3.1.3 Selekttywne odbezpieczenie grup izopropylidenowych

Po selektywnym usunięciu tylko jednej grupy ketalowej z 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny (**2a**), położonego przy pierścieniu A układu trójtterpenowego, otrzymano by strukturę równoważną z syntonem **A1**. Niestety nawet w warunkach słabo kwaśnych nie zaobserwowano żadnej selektywności w usuwaniu grup zabezpieczających. Reakcja hydrolizy przebiegała całkowicie a jej produktem była wolna protoscygenina.

Sytuacja ulega zmianie w momencie wprowadzenia eteru benzylovego w pozycję C28 związku **2a**. W uzyskanej 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-benzylprotoposcygeninie (**9**) zmianie uległa struktura przestrzenna cząsteczki w obrębie atomów węgla w pozycjach C16-C22, wpływając na różnicowanie reaktywności zabezpieczeń w środowisku kwaśnym. Prowadząc pierwsze próbne reakcje w celu doboru

selektywnych warunków usuwania zabezpieczeń ketalowych wykorzystano następujące kwasy: 1M  $\text{HCl}_{\text{aq}}$ , kwas para-toluenosulfonowy oraz trifluorooctowy. Kwas p-toluenosulfonowy nawet w minimalnych, katalitycznych ilościach prowadził do natychmiastowego przereagowania substratu, przy czym powstawały mono-izopropylidenowa pochodna **10** oraz 28-benzyloprotoescygenina wolna od grup zabezpieczających w stosunku 1:1. Z kolei zastosowanie kwasu trifluorooctowego nie powodowało wprowadzie podwójnego odbezpieczenia (28-benzyloprotoescygenina praktycznie niewidoczna na TLC), ale też nie pozwalało na całkowite przereagowanie substratu **9**. Ostatecznie najlepszy wynik osiągnięto dla 1M roztworu chlorowodoru w THF wkraplanego porcjami do roztworu **9**. Bieżąca analiza TLC pozwoliła w kontrolowany sposób otrzymać 16,22-O,O-izopropylideno-28-benzyloprotoescygeninę (**10**, Schemat 20.). Związek uzyskiwano z wysoką wydajnością, przy wysokim stopniu przereagowania substratu oraz jednoczesnym utrzymaniu niskiego poziomu produktu ubocznego tj. 28-benzyloprotoescygeniny. Dodatkowo zaobserwowano, że w reakcji nie powstaje 3,24-O,O-izopropylideno-28-benzyloprotoescygenina.

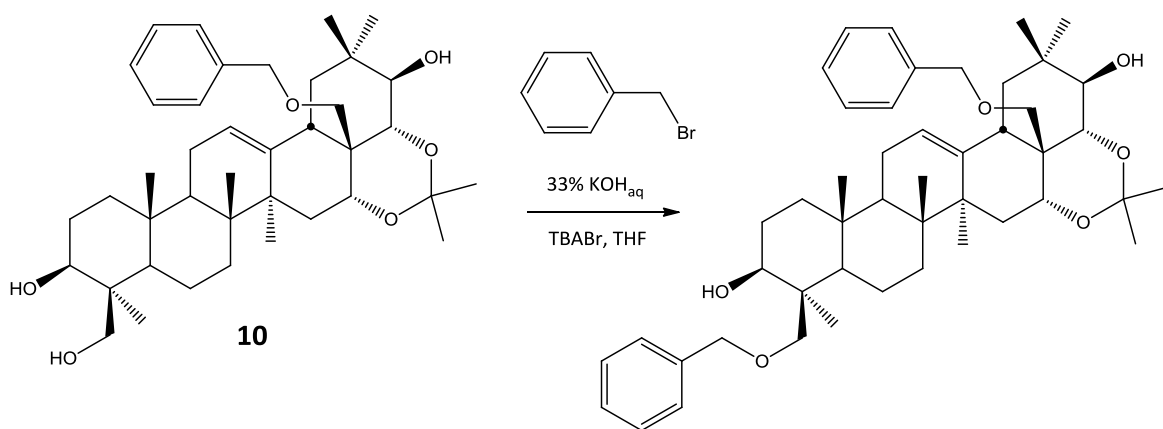


**Schemat 20.** Selektywne usuwanie acetalu izopropylidenu.

### 3.3.1.4 Zabezpieczenie grupy hydroksylowej w pozycji C24

Dobór właściwej grupy zabezpieczającej dla hydroksylu w pozycji C24 staje się ograniczony. Ograniczenie to bierze się z faktu, że w cząsteczce związku **10** znajdują się już dwie wcześniej wprowadzone grupy o zdefiniowanym charakterze chemicznym – acetal izopropylidenowy oraz eter benzylový. Zablokowanie pozycji C24 doprowadzi do pochodnej analogicznej do syntonu **A2**. Wprowadzaną na tym etapie grupę (np. eter allilowy, eter silylowy, etery difenylometylowe) należy dobrać w taki sposób aby istniała potencjalna możliwość jej selektywnego usuwania w obecności grup już w cząsteczce obecnych lub przeciwnie – by nowo wprowadzana grupa była tożsama z już w cząsteczce obecną (w tym przypadku eter benzylový).

W reakcji benzylowania związku **10** w pozycji C24 w warunkach PTC (Schemat 21.) przereagowanie substratu wymaga kilkukrotnego stopniowego dodawania reagentów. W reakcji powstają przynajmniej dwa produkty o zbliżonej polarności, dla których oczyszczanie chromatograficzne nie dało pozytywnego rezultatu.

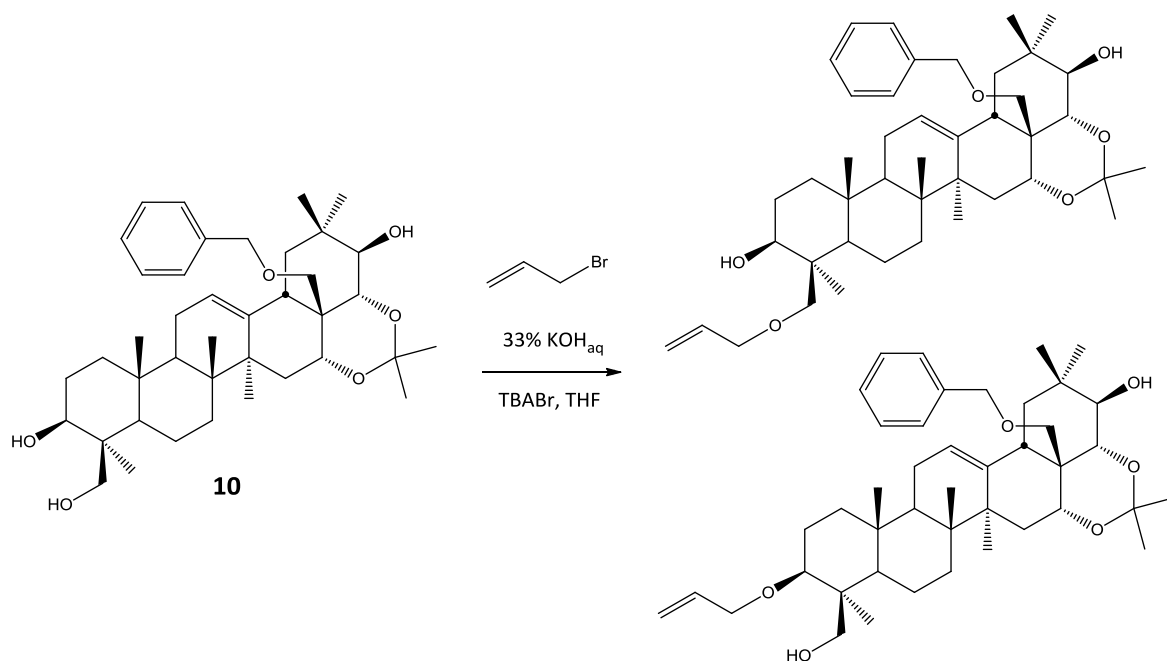


**Schemat 21.** Reakcja benzylowania pozycji C24 w warunkach PTC.

W tożsamyh warunkach PTC prowadzono reakcje z bromkiem allilu jako grupą zabezpieczającą (Schemat 22.). W przypadku substratu **10** wolne są aż trzy potencjalne miejsca podstawienia, chociaż do pozycji C21 ze względu na zawadę steryczną podstawnika benzylový w pozycji C28 dostęp wydaje się utrudniony. Prowadząc reakcję O-alkilowania obserwowano powstawanie produktu, który po doborze właściwego eluenta do chromatografii TLC okazał się mieszaniną przynajmniej dwóch związków



o niemal identycznej polarności. Możliwe, że produktów reakcji jest więcej ale ich zbliżona polarność nie pozwala na efektywne rozseparowanie i scharakteryzowanie pojedynczych indywiduów. Zmiany w ilości użytego bromku allilu jak również obniżenie temperatury do oraz poniżej 0°C nie wpłynęły zauważalnie na dystrybucję produktów. Wyizolowane frakcje zawierały mieszaniny produktów reakcji w różnej proporcji, co nie pozwoliło na potwierdzenia struktury związków.

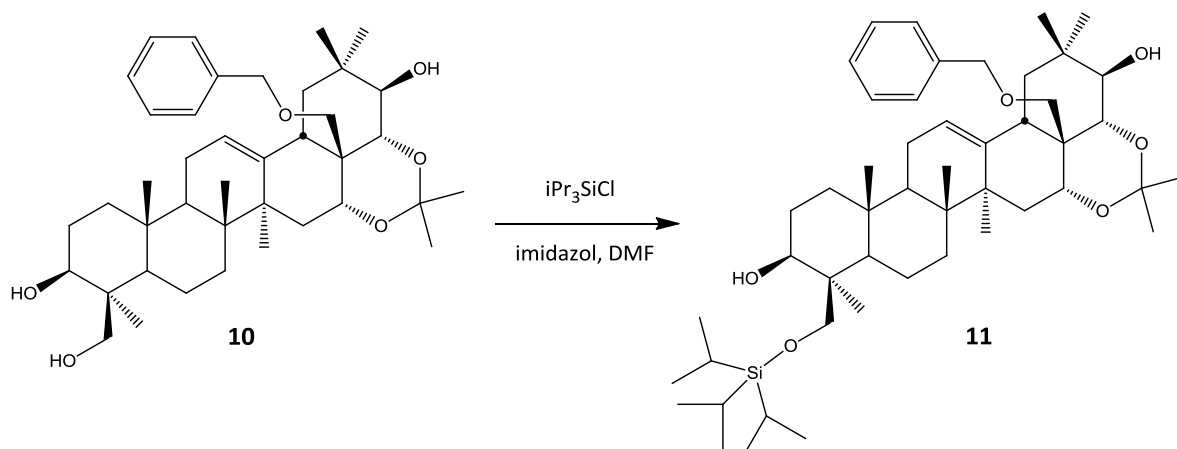


**Schemat 22.** Reakcja podstawienia bromkiem allilu – dwa możliwe produkty (trzeci potencjalny produkt - substytucja pozycji C21 mało prawdopodobna).

Następnie przeprowadzono próby wprowadzenia zabezpieczenia difenylometylowego w pozycję C24 za pomocą bromku difenylometylu. Nie obserwowano tworzenia produktu reakcji w warunkach PTC.

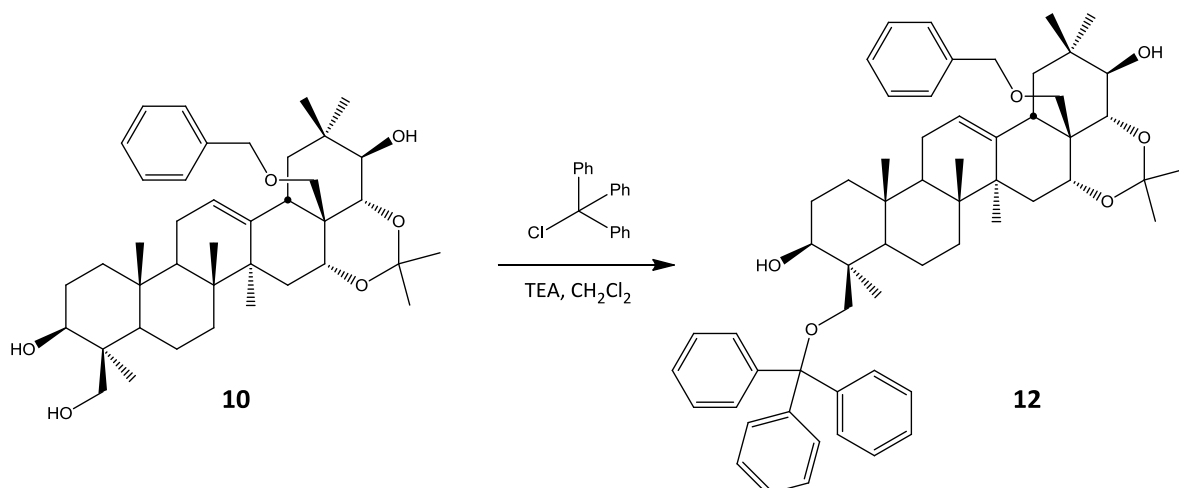
Pozytywny wynik osiągnięto natomiast wprowadzając zabezpieczenie O-sililowe w reakcji z chlorkiem triizopropylsililu (TIPSCI) w standardowych warunkach (imidazol/DMF). Wspomniany chlorek wybrano z puli dostępnych chlorków sililowych ze względu na największą teoretyczną odporność powstającego eteru sililowego na warunki zasadowe, nawet do pH = 12.<sup>83</sup> Otrzymany główny produkt, po izolacji i oczyszczeniu chromatograficznym (kilka drobnych zanieczyszczeń), analizowano potwierdzając

strukturę 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-benzylo-24-(triizopropylsililo)-protoescygeniny (**11**, Schemat 23).



**Schemat 23.** Reakcja silylowania pozycji C24.

Podczas prób podstawienia pozycji C24 powrócono do reakcji trytylowania, eksplorowanej już wcześniej z negatywnym skutkiem (podrozdział 3.3.1.2). Kontynuacja poszukiwania właściwych warunków do przeprowadzenia modyfikacji związku **10** w pozycji C24 zaskutkowała znalezieniem układu w postaci trietyloaminy (TEA) w chlorku metylenu. W opracowanych warunkach osiągnięto całkowite przereagowanie substratu jednocześnie obserwując powstawanie jedynie śladów zanieczyszczeń. W tym przypadku chromatograficzne doczyszczanie surowego produktu nie powodowało jego degradacji, dlatego potwierdzono strukturę związku selektywnie zabezpieczonego w pozycji C-24 czyli 16,22-O,O-diizopropylideno-28-benzylo-24-(trifenylometylo)-protoescygeniny (**12**, Schemat 24).



**Schemat 24.** Reakcja trytylowania pozycji C24.

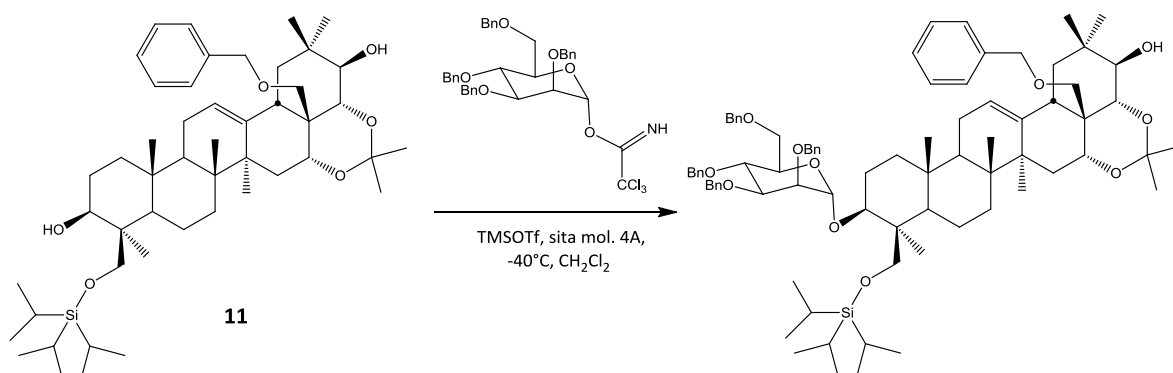
### 3.3.1.5 Funkcjonalizacja grupy hydroksylowej w pozycji C3

W poprzednim podrozdziale opisano otrzymanie dwóch pochodnych równoważnych z syntonem **A2** (Schemat 14.), czyli związków **11** oraz **12**. Grupy zabezpieczające teoretycznie umożliwiają reakcję tylko w pozycji C3, ponieważ pozycja C21 wykazywała w dotychczas prowadzonych reakcjach niską reaktywność zatem można ją zaniedbać. Aby osiągnąć planowany cel, jakim jest mimetyk escyny powinno się w pozycję C3 wprowadzić podstawnik cukrowy, przy czym na tym etapie prac badawczych jego struktura oraz sposób przyłączenia odgrywały rolę drugorzędną. Sugerując się wiedzą literaturową wybrano dwie metody planowanej funkcjonalizacji:

- ✓ bezpośrednie glikozydowanie z użyciem anomerycznego iminoestru (donoru Schmidta);
- ✓ pośrednie przyłączenie monosacharydu poprzez łącznik triazolowy.

Wybór pierwszej z metod - z użyciem donoru Schmidta - podyktowany był warunkami w jakich prowadzi się ten specyficzny typ glikozydowania.<sup>107,108</sup> Zabezpieczony cukier z anomeryczną grupą hydroksylową zmodyfikowaną do postaci chloroimidanu wraz z trifluorometylosulfonianem trimetylosililu (TMSOTf) i sitami molekularnymi reaguje w temperaturze -40°C, warunki te są zatem wyjątkowe ze względu na kwasowrażliwe grupy izopropylidenowe i trifenylometylowe a także

kwaso- i zasadowrażliwą grupę siliłową użyte do zabezpieczenia pochodnych trójterpenowych (Schemat 25.).



**Schemat 25.** Glikozydowanie pozycji C3 z wykorzystaniem donoru Schmidta.

Obserwując postęp reakcji na TLC widoczne jest wyczerpanie substratu trójterpenowego oraz cukrowego i powstanie jednego głównego produktu. Produkt ulega rozpadowi podczas oczyszczania chromatograficznego (mimo dodatku  $\text{Et}_3\text{N}$  do eluenta) – z kolumny odzyskano cukier z wolną anomeryczną grupą hydroksylową oraz związek **11**.

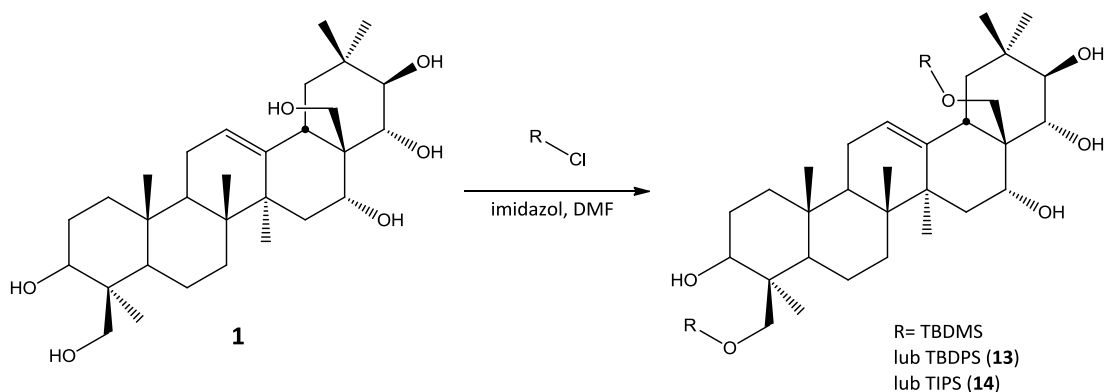
Jako alternatywę dla bezpośredniego glikozydowania podjęto próbę pośredniego przyłączenia cukru mostkiem triazolowym metodą „*Click chemistry*”, której skuteczności dowiedziono we wcześniej prowadzonych eksperymentach (rozdział 3.2). Ze względu na silnie zasadowe warunki wprowadzania eteru propargilowego do tej procedury wybrano jako substrat 28-benzylo-24-(trifenylometylo)-16,22-O,O-izopropylideno-protoescygeninę (**12**) (sprawdzono doświadczalnie, że grupa siliłowa pochodnej **11** nie wytrzymuje nawet umiarkowanie zasadowych warunków). Zastosowanie sprawdzonych warunków PTC oraz reakcje z użyciem wodoru sodu jako silnej zasady tym razem nie przyniosło oczekiwanych rezultatów – reakcja nie zachodzi. Powodem negatywnego wyniku może być rzędowość grupy hydroksylowej C3 jak również zawada steryczna jaką tworzy położony relatywnie blisko rozbudowany podstawnik trytylowy.

### 3.3.2 Ścieżka 2. – *disililoproteoscygenina*

#### 3.3.2.1 Sililowe etery I-rzędowych grup hydroksylowych

Równoległe do ścieżki 1. (podrozdział 3.3.1) przeprowadzono szereg reakcji prowadzących do syntonu **AC3** (Schemat 14.) inną drogą. Wykonano reakcje, których celem było otrzymanie eterów sililowych na I-rzędowych grupach hydroksylowych, tym samym otrzymując związek równoważny z syntonem **B2**. Wykorzystano trzy najpopularniejsze chlorki sililowe: TBDMSCl, TBDPSCI<sup>109</sup> oraz TIPSCI (*i*Pr<sub>3</sub>SiCl).

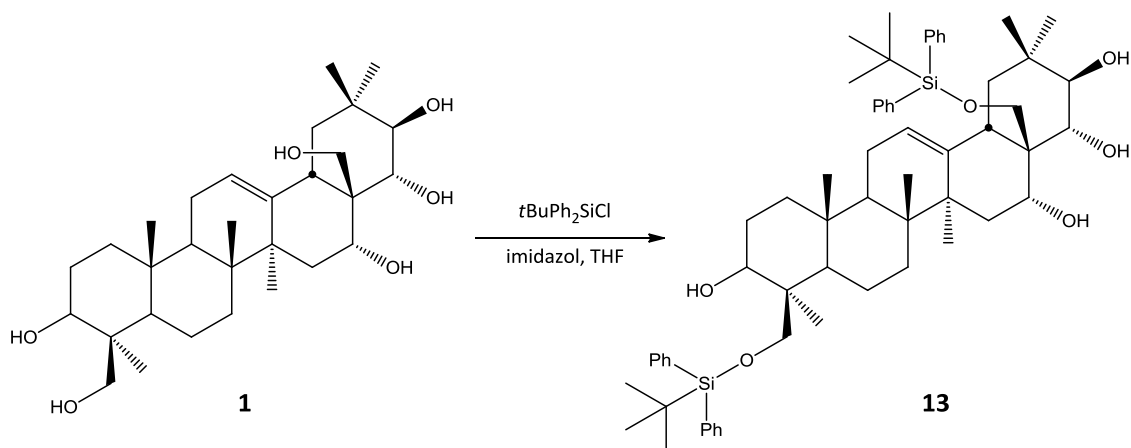
Protoescygenina w reakcji z chlorkami sililowymi tworzy, zależnie od użytego odczynnika sililującego, jedną (TBDPSCI) lub dwie (TIPSCI) pochodne mono- oraz jedną dipodstawioną (Schemat 26.). Początkowo w reakcji powstają pochodne mono (dla TIPSCI charakteryzują się bliskimi współczynnikami  $R_f$ , prawie nierozróżnialne na TLC) oraz dipodchodna, w celu wyczerpania substratu oraz pośrednich monopochodnych reakcję prowadzi się z nadmiarem chlorku przez dłuższy czas. W przypadku chlorku *tert*-butylodimetylosililowego wyczerpanie substratu nie jest możliwe ponieważ zastosowanie nadmiaru odczynnika prowadzi do powstawania coraz wyżej podstawionych (mniej polarnych) produktów, czego nie obserwuje się stosując chlorek *tert*-butylodifenylosililowy i triizopropylosililowy. Biorąc to pod uwagę, jak również fakt potencjalnie większej odporności grup TBDPS i TIPS na warunki kwaśne oraz zasadowe, odrzucono użyteczność grupy TBDMS w kolejnych eksperymentach.



**Schemat 26.** Reakcje wprowadzenia eterów sililowych (główny produkt dipodstawiony).

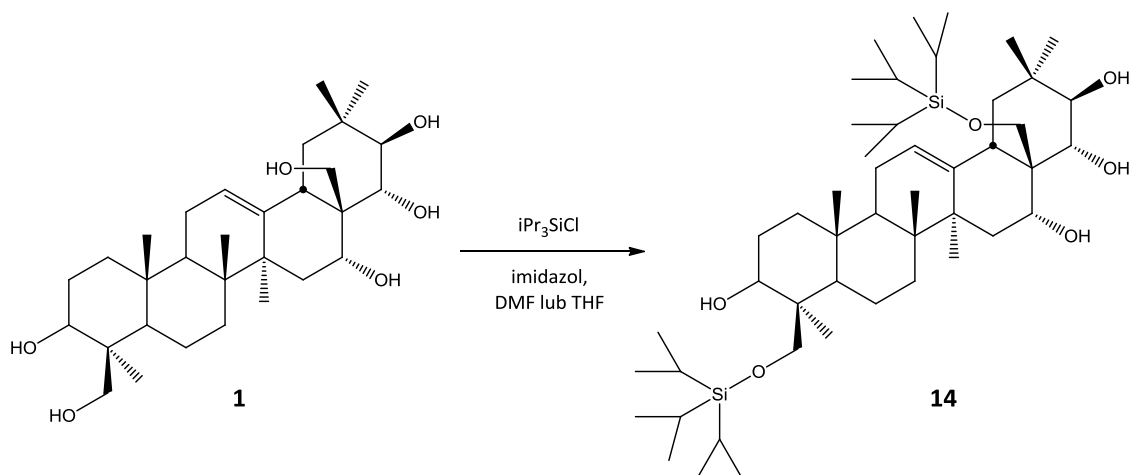
Reakcje z chlorosilanami prowadzono w typowym układzie (imidazol/DMF) w temperaturze pokojowej a z wcześniejszych doświadczeń wynikało, że korzystnie jest dodawać reagenty w dwóch porcjach (po ok. 1,5 eq). W takim wypadku zanik protoescygeniny jest szybki, jednak całkowite podstawienie powstających mono-pochodnych wymaga dłuższego czasu prowadzenia reakcji (nawet kilku dni). W przypadku dodania reagentów w jednej porcji pozostaje pewna ilość nie przereagowanej monopochodnej. Dla grupy TIPS konieczne jest dodanie trzeciej porcji reagentów by wyczerpać związki monopodstawione.

W przypadku dipodstawionej pochodnej z TBDPS surowy produkt reakcji najpierw oczyszczano chromatograficznie, a następnie krystalizowano z metanolu. W ten sposób osiągnięto wysoką czystość (powyżej 98%), jednak wiązało się to z niską wydajnością sumaryczną procesu. Próby oczyszczania surowego produktu tylko przez krystalizację (z metanolu oraz innych rozpuszczalników) nie były skuteczne. Reakcje prowadzone w DMF dają surowy produkt w postaci oleju zawierającego resztki trudnego do usunięcia, wysokowrzącego rozpuszczalnika, co dodatkowo sprawia problemy podczas prób krystalizacji. Wprowadzenie do obróbki podwójnej ekstrakcji chloroformem, a następnie MTBE ograniczyły ilość DMF w surowych produktach jednak nie wyeliminowały go całkowicie. Z tego względu ostatecznie reakcje silylowania prowadzono w THF, co znacznie uprościło późniejszą izolację produktu. Najlepsze rezultaty oczyszczania mieszaniny poreakcyjnej osiągnięto dla układu ekstrakcyjnego MTBE-heksan. Stosując opisaną metodę otrzymano 24,28-O-bis-(tert-butyldifenylsililo)-protoescygeninę (**13**, Schemat 27.) z wydajnością powyżej 80% oraz czystości HPLC powyżej 90%. Próby dalszego podniesienia czystości poprzez kolejne krystalizacje nie przyniosły zadowalających rezultatów, dlatego taką czystość uznano za wystarczającą do zastosowania w kolejnych etapach syntezy.



**Schemat 27.** Reakcja zabezpieczenia pozycji C24 i C28 grupą TBDPS.

W przypadku dipodstawionej pochodnej z TIPS po ekstrakcji z MTBE i pozbyciu się większości DMF lub THF otrzymano rzadki jasnożółty olej, który w obniżonej temperaturze (lodówka) wypada jako bezpostaciowy żółtawy osad. Osad ten po rozpuszczeniu w heksanie w temperaturze pokojowej wypada po kilku minutach ponownie już w postaci białych kryształów. W ten sposób usunięto przeważającą część zanieczyszczeń i uzyskano czystość umożliwiającą potwierdzenie struktury 24,28-O-bis-(triizopropyllosililo)-protoescygeniny (**14**, Schemat 28.).

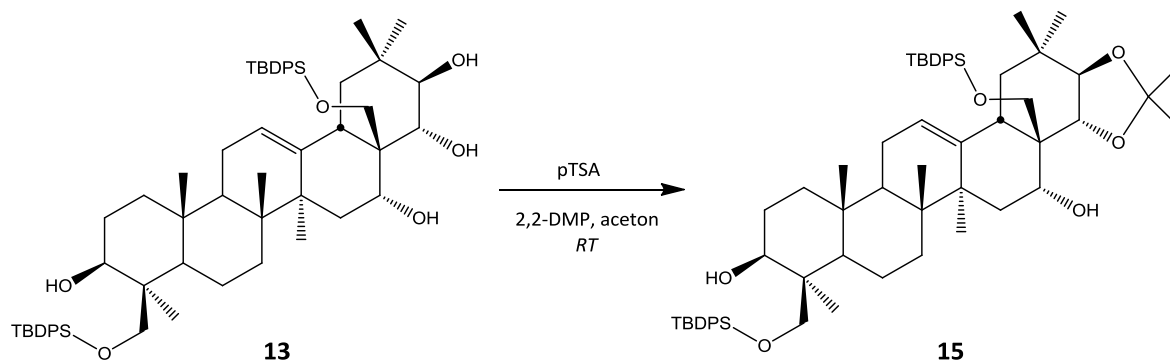


**Schemat 28.** Reakcja zabezpieczenia pozycji C24 i C28 grupą TIPS.

### 3.3.2.2 Acetonidowanie eterów siliowych

Dysponując doświadczeniem z zabezpieczenia protoescygeniny ketalami (podrozdział 3.3.1.1) etery siliowe poddano reakcji acetonidowania w sprawdzonych już

warunkach. W reakcji 24,28-bis-(tert-butyldifenylsililo)-protoescygeniny (**13**) w mieszaninie 2,2-DMP/aceton wobec katalitycznych ilości pTSA otrzymano jeden główny produkt, który wyizolowano i oczyszczono chromatograficznie. Analiza NMR i MS potwierdziła strukturę 24,28-bis-(tert-butyldifenylsililo)-21,22-O,O-izopropylideno-  
protoescygeniny (**15**, Schemat 29.), która jest równoważna ze strukturą syntonu **C2** (Schemat 14).



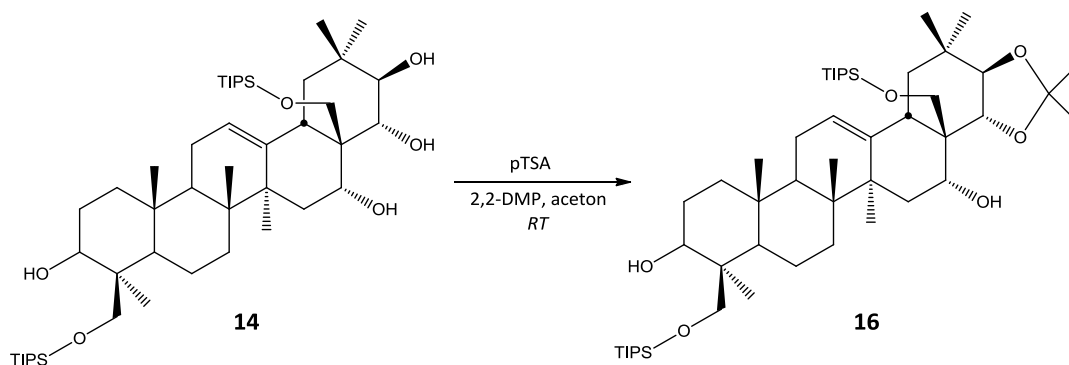
**Schemat 29.** Reakcja acetonidowania 24,28-bis-(tert-butyldifenylsililo)-protoescygeniny.

Powtarzając reakcję opracowano wstępną metodę oczyszczania surowego produktu. Acetonidowanie zachodzi (w temperaturze pokojowej) w ciągu kilkunastu minut z całkowitym przereagowaniem substratu. Zastąpienie acetonu innym rozpuszczalnikiem (DMF, THF) nie poprawiło (w THF znacznie pogorszyło) w zauważalny sposób sumarycznej czystości ani dystrybucji zanieczyszczeń. Istotnymi parametrami mającymi wpływ na jakość powstającego produktu są czas oraz użycie nadmiaru 2,2-DMP. W przypadku przedłużania czasu reakcji (która po 1h jest zakończona) oprócz właściwego produktu powstawało mniej polarne niezidentyfikowane zanieczyszczenie. Eksperymentalnie wykazano, że chromatograficzne oczyszczenie surowej pochodnej nie jest zasadne. Nie znaleziono takich warunków rozdzielania, które prowadziłyby do podniesienia czystości produktu po chromatografii. Z tego powodu czystość HPLC surowego osadu po reakcji na poziomie 90% uznano za wystarczającą do wyodrębniania oraz dalszych modyfikacji pochodnej **15**.

Analogiczny do powyższego produkt **16** otrzymano prowadząc acetonidowanie 24,28-bis-(triizopropylsililo)-protoescygeniny (**14**). Wprawdzie w reakcji obserwowano dwa związki uboczne o polarności niemal identycznej jak produktu głównego a także kilka mniej znaczących zanieczyszczeń, jednak krystalizacja surowego osadu z heksanu prowadzi



do czystego związku - 24,28-bis-(triizopropylsilo)-21,22-O,O-izopropylidenoprotoscygeniny (**16**, Schemat 30.), którego struktura została potwierdzona przez analizę widm NMR.

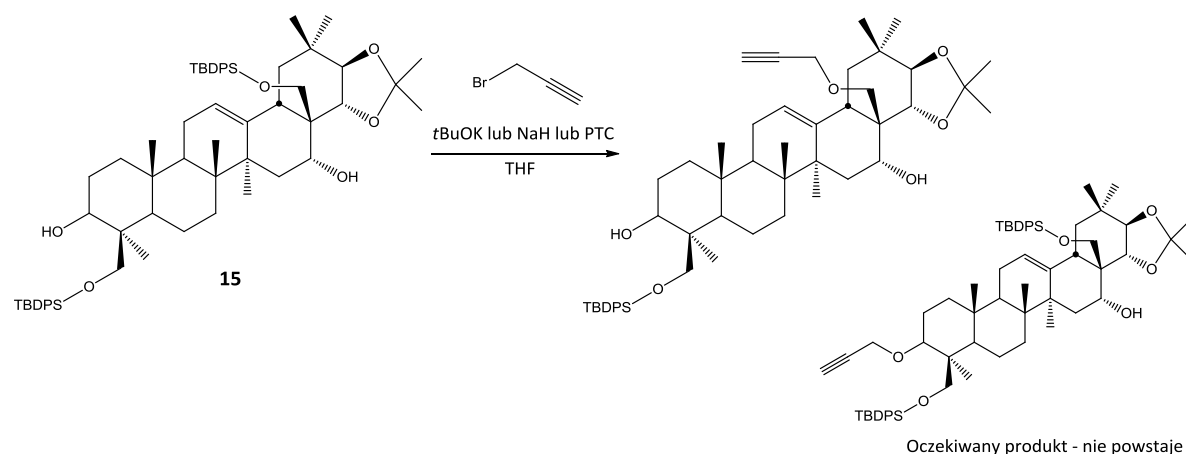


**Schemat 30.** Reakcja acetonidowania 24,28-bis-(triizopropylsilo)-protoescygeniny.

### 3.3.2.3 Funkcjonalizacja grupy hydroksylowej w pozycji C3

Pochodne **15** oraz **16** spełniają założenia dla struktury syntonu **C2** z analizy retrosyntetycznej, stanowią alternatywę dla modyfikacji opisanych w podrozdziale 3.3.1.5 Funkcjonalizacja grupy hydroksylowej w pozycji C3. Analogicznie do reakcji z podrozdziału 3.3.1.5 próby modyfikacji grupy hydroksylowej w pozycji C3 ponownie zakończyły się wynikiem negatywnym. Prowadząc reakcję wymiany protonu grupy hydroksylowej w położeniu C3 należy liczyć się z możliwym podstawianiem grupy C16 (analogicznie do grupy C21 w związku **3a**). Jednakże liczne doświadczenia wykazały, że pozycja C16 jest mało reaktywna w przeważającej większości warunków co wpływa na selektywność substytucji w takim układzie. W reakcji **15** oraz **16** z bromkiem propargilu wobec *t*BuOK lub NaH otrzymano zanieczyszczone mieszaniny pochodnych z jednym związkiem powstającym w przewodzie. Próby w warunkach PTC (10-33% KOH<sub>aq</sub>, TBABr) dały podobny efekt. Powstający główny produkt wyizolowano, analiza NMR wskazała, że propargilowanie nie następuje w pozycji C3 jak oczekiwano ale w C28 po uprzednim odszczepieniu grupy sililowej, przy czym druga grupa sililowa w C24 pozostaje nienaruszona (Schemat 31.). Otrzymane pochodne są zatem analogiczne do układu 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoscygeniny (**3a**, podrozdział 3.2.1). Próby znalezienia warunków propargilowania, w których obie grupy sililowe

pozostawały stabilne nie powiodły się. W reakcjach PTC (ciecz-ciało stałe) w warunkach bezwodnych, gdzie jako zasad użyto węglanów metali (m.in.  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  i  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) nie obserwowano postępu reakcji.



**Schemat 31.** Reakcja propargilowania 24,28-bis-(tert-butyldifenylsililo)-21,22-O,O-izopropylideno-proteoescygeniny.

Warto zwrócić uwagę, że tym razem grupy siliłowe na pozycji C24 pozostały nienaruszone w warunkach towarzyszących wprowadzeniu podstawnika propargilowego. Zupełnie inaczej niż miało to miejsce w pochodnej **11**, w której inne zabezpieczenie siliłowe (TIPS) usuwało się w tożsamy warunkach.

### 3.4 Próby selektywnego wprowadzenia innych grup funkcyjnych w miejsce grupy hydroksylowej

W pochodnej **2a** zabezpieczono grupami ochronnymi cztery z sześciu grup hydroksylowych protoescygeniny, dzięki czemu w dalszych reakcjach podstawienia mogą powstać teoretycznie trzy związki. Co więcej, o czym była mowa już wcześniej, obie wolne grupy hydroksylowe znacząco różnią się właściwościami - grupa I-rzędowa w pozycji C28 jest bardziej aktywna od II-rzędowej w pozycji C21. Właśnie z tego powodu jak również ze względu na dostępność większej ilości tej pochodnej mogła ona z powodzeniem pełnić funkcję testową a wypróbowane na niej metody podstawień oraz innych modyfikacji byłyby wykorzystane dla późniejszych, bardziej rozbudowanych pochodnych. W pierwszej

kolejności wybrano takie grupy, które umożliwiają następne reakcje z ich wykorzystaniem.

Potencjalnie użytecznymi mogą więc być:

- ✓ halogenki i pseudohalogenki - grupy łatwo odchodzącą jak Br-, I-, grupa tosyłowa oraz mesyłowa;
- ✓ grupy powstałe w wyniku utlenienia (grupa karbonyłowa lub karboksylowa);
- ✓ związki pełniące funkcję łącznika - *linkera* (o charakterze liniowym lub cyklicznym);
- ✓ mostek tlenowy między dwiema spośród grup hydroksylowych.

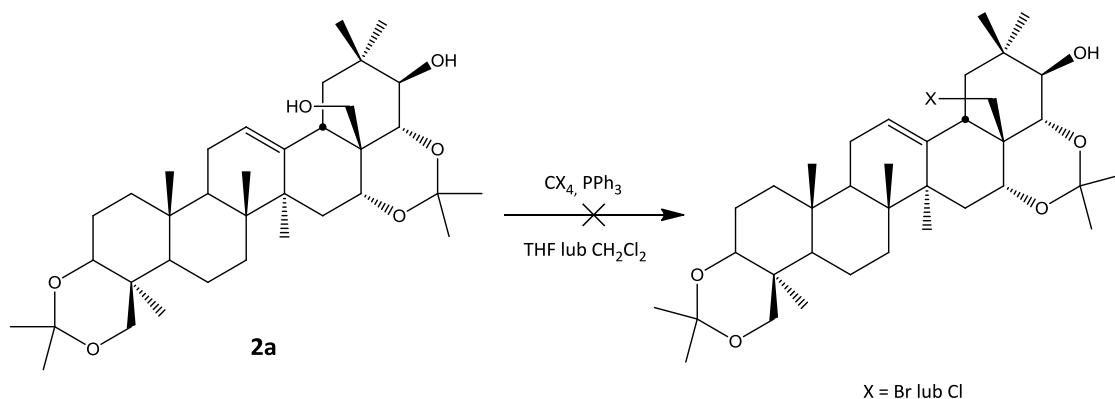
### 3.4.1 Bezpośrednie transformacje grupy hydroksylowej

#### 3.4.1.1 Halogenki i pseudohalogenki

W pierwszej kolejności podjęto próby otrzymania estrów prostych kwasów sulfonowych. Wykorzystanie tych związków wydawało się praktyczniejsze od syntezy bromków lub jodków. W reakcji z chlorkiem tosyłu nie obserwowano postępu reakcji, natomiast z chlorkiem mesyłu powstają dwa produkty o polarności na tyle zbliżonej, by uniemożliwić ich rozdział. Wykonane w późniejszym czasie pomiary techniką LC-MS na mieszaninie produktów nie potwierdziły zgodności masy powstających produktów ze związkiem pożądanym. Nie udało się dokładnie scharakteryzować związków w mieszaninie, wiadomo natomiast, że ich masy były niższe od masy protoescygeniny, co wskazuje na możliwość zmiany struktury trójterpenu w warunkach reakcji.

W związku z negatywnym wynikiem reakcji otrzymywania tosyłanu i mesyłanu podjęto próby uzyskania halogenków bezpośrednio - w reakcji Appel'a (Schemat 32.).<sup>110,111</sup> W prowadzonych równolegle reakcjach w THF oraz chlorku metylenu obserwowano całkowity zanik substratu, jednak uzyskane produkty nie były tymi, których się spodziewano. Polarność powstałego związku była bardzo bliska polarności protoescygeniny (**1**), co może sugerować rozkład substratu (zdjęcie izopropylidenów) w warunkach prowadzenia reakcji. Dwa inne produkty widoczne na TLC zidentyfikowano

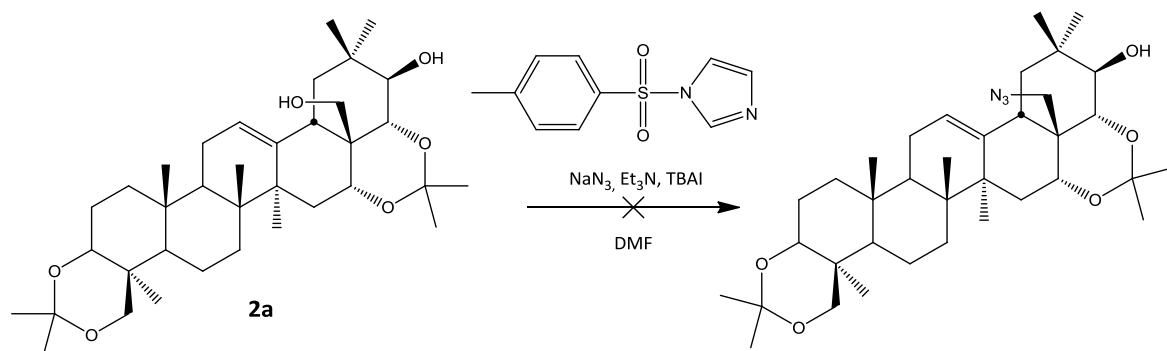
jako trifenylofosfinę ( $\text{PPh}_3$ ) oraz kompleks trifenylofosfina – produkt pośredni powstający w jednym z etapów reakcji Appel’a.



**Schemat 32.** Reakcja Appel’a – zamiana grupy hydroksylowej na halogenek.

Po niepowodzeniu poprzedniej metodologii przetestowano wariant reakcji Appel’a z jodem i trifenylofosfiną w acetonitrylu oraz chlorku metylenu. Analiza LC-MS mieszanin poreakcyjnych z reakcji w acetonitrylu jak i chlorku metylenu nie potwierdziła obecności związku o oczekiwanej masie.

Kolejną alternatywą dla tradycyjnej reakcji Appel’a był jej wariant z wykorzystaniem tosyłanu imidazolu do modyfikacji grupy hydroksylowej w grupę azydkową.<sup>112</sup> Otrzymany przed reakcją tosyłan imidazolu oraz azydek sodu używano wobec trietyloaminy i katalitycznej ilości katalizatora przeniesienia fazowego (TBAI) w próbie otrzymania odpowiedniej pochodnej 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-protoescygeniny (Schemat 33.). Obserwowano jeden główny produkt przy nie przereagowanym całkowicie substracie. Obecność spodziewanego azydku nie została potwierdzona metodą LC-MS.



**Schemat 33.** Reakcja Appel’a wprowadzenia grupy azydkowej w wariantcie z tosyłanem imidazolu.

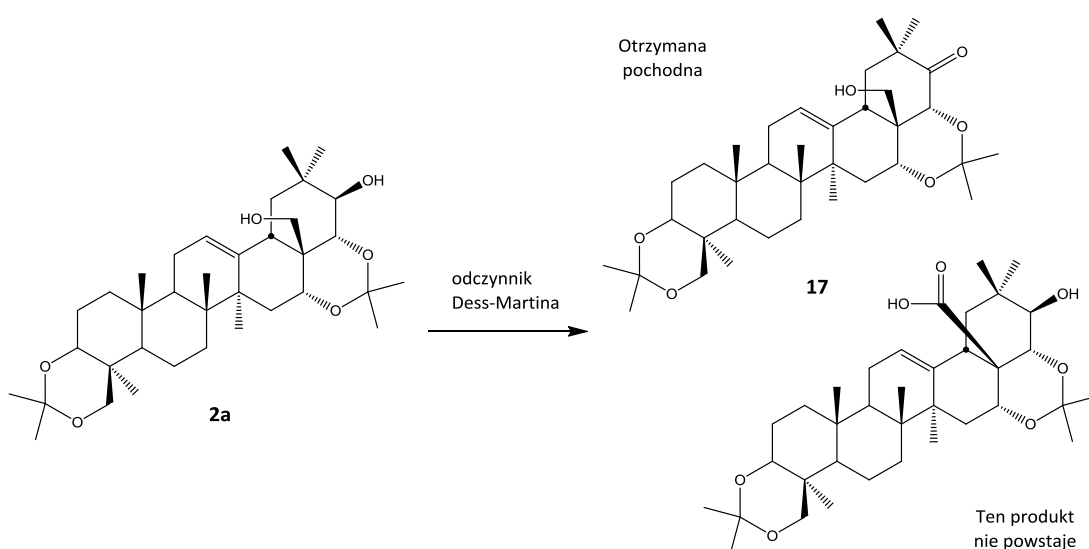
### 3.4.1.2 Próby utleniania grupy hydroksylowej

Wyjątkowo interesujące z punktu widzenia dostępu do nowych klas reakcji wydawało się selektywne utlenienie hydroksylu do grupy karbonylowej lub karboksylowej w pozycji C28. Utlenienie pozycji C21 uznano za mniej interesujące z uwagi na ograniczoną pulę reakcji następnych prowadzących do derywatyzacji pochodnej z grupą karbonylową w pozycji C-21. Ponieważ związek wyjściowy 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-proteoescygenina (**2a**) może wykazywać ograniczoną odporność na warunki utleniające, po przeglądzie literatury wybrano kilka najpopularniejszych i najczęściej wykorzystywanych, ale jednocześnie umiarkowanie agresywnych, układów utleniających:

- ✓  $\text{KMnO}_4$ ,
- ✓ Kompleks  $\text{CrO}_3$ /pirydyna (odczynnik Collinsa),<sup>113</sup>
- ✓  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$  oraz  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$ ,
- ✓ TEMPO (2,2,6,6-tetrametylopiperidyno-1-oksyl)/NaOCl,<sup>114-116</sup>
- ✓ Odczynnik Dess-Martina (1,1,1-triacetoksy-1,1-dihydro-1,2-benziodoksol-3(1H)-on).<sup>117,118</sup>

Działając TEMPO lub kompleksem trójtlenku chromu otrzymano ten sam produkt, przy czym w pierwszym przypadku substrat przereagowuje całkowicie, natomiast w reakcji z  $\text{CrO}_3$  stopień przereagowania jest niewielki. Wyizolowany produkt po oczyszczeniu poddano analizie spektroskopowej IR oraz NMR. Widmo w podczerwieni wyraźnie wskazuje na obecność grupy karbonylowej. Pomimo przeprowadzenia eksperymentów NMR nie rozwiązano pełnej struktury wyizolowanego związku, z uwagi na obecne w nim zanieczyszczenia. W próbkach o czystości ok. 95% na widmie NMR kluczowe sygnały nakładały się z sygnałami generowanymi przez zanieczyszczenia o strukturze zbliżonej do produktu. Aby w pośredni sposób potwierdzić obecność grupy karbonylowej w pozycji C28 otrzymaną pochodną poddano m.in. reduktywnemu aminowaniu ( $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ /amina), reakcji Wittiga z odpowiednim ilidem, a także charakterystycznej reakcji z semikarbazidem. Ponieważ żadna z przeprowadzonych prób nie dała pozytywnego wyniku uznano strukturę produktu utlenienia za niepotwierdzoną.

Prowadząc reakcję z odczynnikiem Dess-Martina otrzymano inny, bardziej polarny produkt niż poprzednio. Reakcja do pewnego stopnia zachodzi bardzo szybko, pozostaje jednak nieprzereagowany substrat, którego nie ubywa mimo wydłużenia czasu prowadzenia procesu. Wyizolowaną i oczyszczoną chromatograficznie pochodną poddano analizie NMR, która wykazała powstanie produktu utlenienia grupy hydroksylowej w pozycji C21 do ketonu. Nie było to zgodne z poczynionymi założeniami, które przewidywały utlenienie do aldehydu/kwasu karboksylowego grupy hydroksylowej w pozycji C28 (**17**, Schemat 34.).



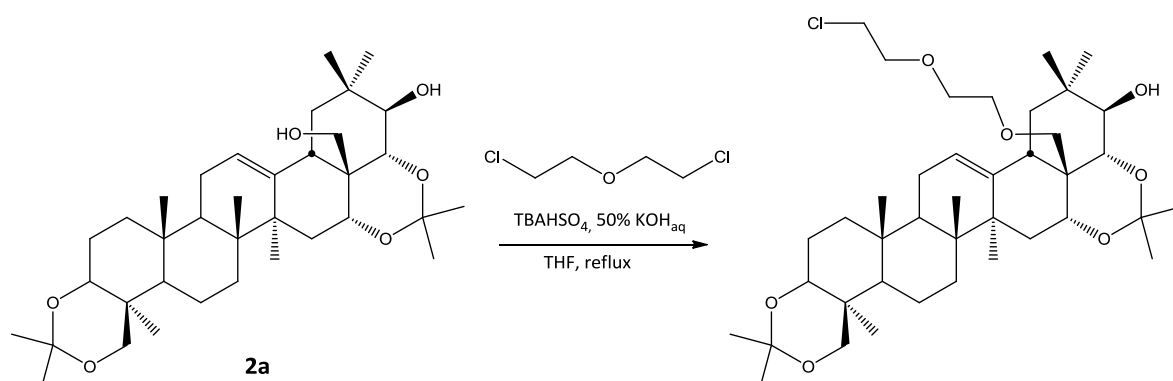
**Schemat 34.** Wynik utleniania 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny odczynnikiem Dess-Martina.

Próby utleniania przy pomocy pozostałych odczynników ( $\text{KMnO}_4$  oraz sole żelaza) zakończyły się wynikiem negatywnym. Siła utleniająca tych układów jest zbyt duża, dlatego w warunkach reakcji 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygenina ulega rozpadowi.

### 3.4.2 Wykorzystanie alifatycznych łączników do wprowadzenia nowej grupy funkcyjnej

Niepowodzenie metod wprowadzenia halogenku (podrozdział 3.4.1.1) spowodowało poszukiwanie możliwości wprowadzenia ugrupowania łącznikowego zawierającego atom chlorowca w terminalnym położeniu, na przykład alkilując 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeninę za pomocą eteru bis-2-chloroetylowego

(jako rozpuszczalnik i reagent jednocześnie) w warunkach PTC (Schemat 35.). Otrzymano jeden produkt, jednak napotkano na trudności podczas izolacji z mieszaniny reakcyjnej polegające na oddzieleniu produktu od nieprzereagowanego eteru. Techniki chromatograficzne nie dały zadowalającego rezultatu, natomiast próba oddestylowania wysokowrzącego eteru skończyła się rozkładem produktu.



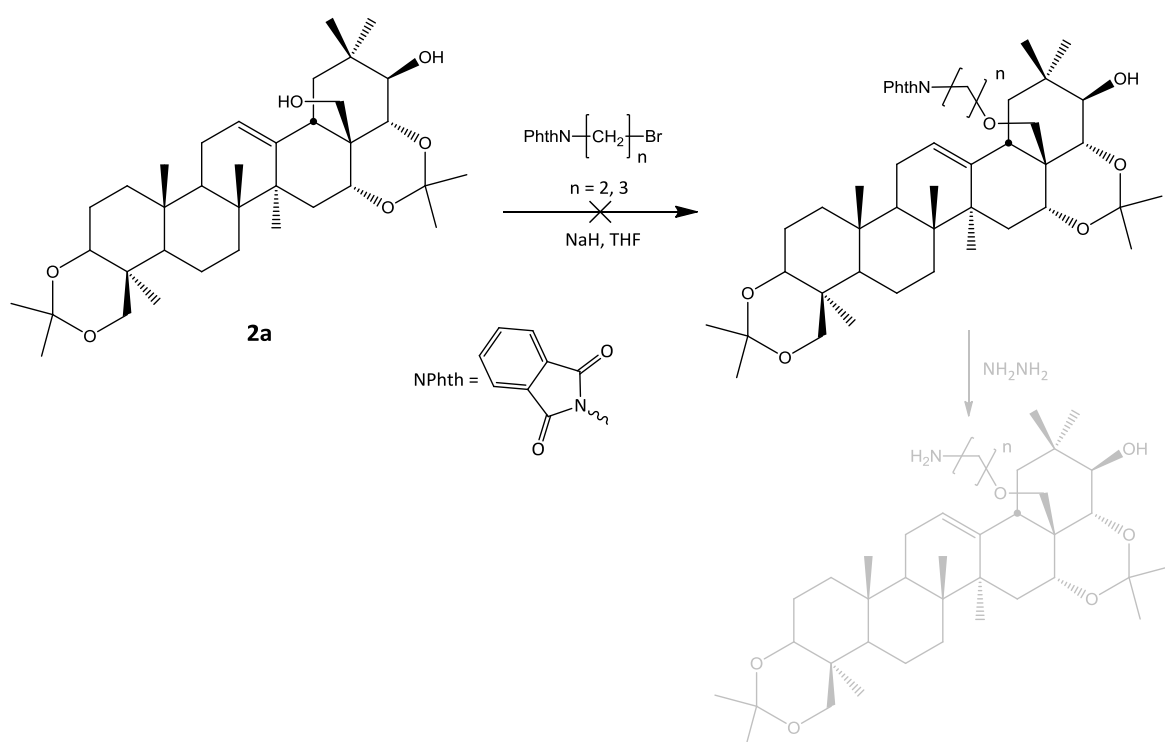
**Schemat 35.** Reakcja z eterem bis-2-chloroetylowym jako metoda pośredniego wprowadzenia halogenu.

Alternatywnie halogenek można wprowadzić z zastosowaniem reakcji Mitsunobu podstawienia grupy hydroksylowej. W reakcjach tego typu odczynnikiem nukleofilowym może być kwas karboksylowy (taki wariant stosowany jest najpowszechniej), jednak publikowano także przykłady z imidami, fenolami oraz sulfonamidami.<sup>119-121</sup> Stosując tradycyjne warunki, czyli azodikarboksylan diizopropylu (DIAD) oraz trifenylofosfinę w THF nie uzyskano spodziewanego eteru z p-bromofenolem, stopień przereagowania substratów był znikomy. Ponieważ kolejność dodawania reagentów może mieć znaczenie w reakcjach typu Mitsunobu wprowadzano zmiany, jednak żadna nie polepszyła stopnia przereagowania.

Podobne założenia zakładające wykorzystanie elementów łącznikowych (*linkerów*) przyjęto chcąc wprowadzić inne niż halogenki grupy funkcyjne. Pierwszym wyborem były dwie popularne grupy dające dostęp do nowych klas reakcji – grupa aminowa oraz karboksylowa (jako alternatywa dla prób utleniania z podrozdziału 3.4.1.2).

Terminalną grupę aminową można uzyskać na przykład przez wprowadzenie do cząsteczki N-(bromoalkilo)ftalimidu w wyniku reakcji eteryfikacji, a następnie transformację do grupy aminowej (np. przez hydrazynolizę)(Schemat 36.). Jednakże w reakcji 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny z N-(2-bromoetylo)ftalimidem

oraz N-(3-bromopropyl)ftalimidem w silnie zasadowych warunkach wobec NaH kontrola reakcji (TLC) wskazywała na jej niewielki postęp. Ponadto w obu przypadkach długotrwałe ogrzewanie w temperaturze wrzenia oraz kilkukrotne dodawanie reagentów nie pozwoliło na osiągnięcie wystarczającego stopnia przereagowania, a jedynie prowadziła do stopniowej degradacji substratów. Inne warunki prowadzenia reakcji, wobec *t*BuOK oraz PTC dały wyniki negatywne. Potencjalną alternatywą mogła być reakcja Mitsunobu z N-hydroksyftalimidem. Również w tym wypadku nie osiągnięto zauważalnego stopnia przereagowania.

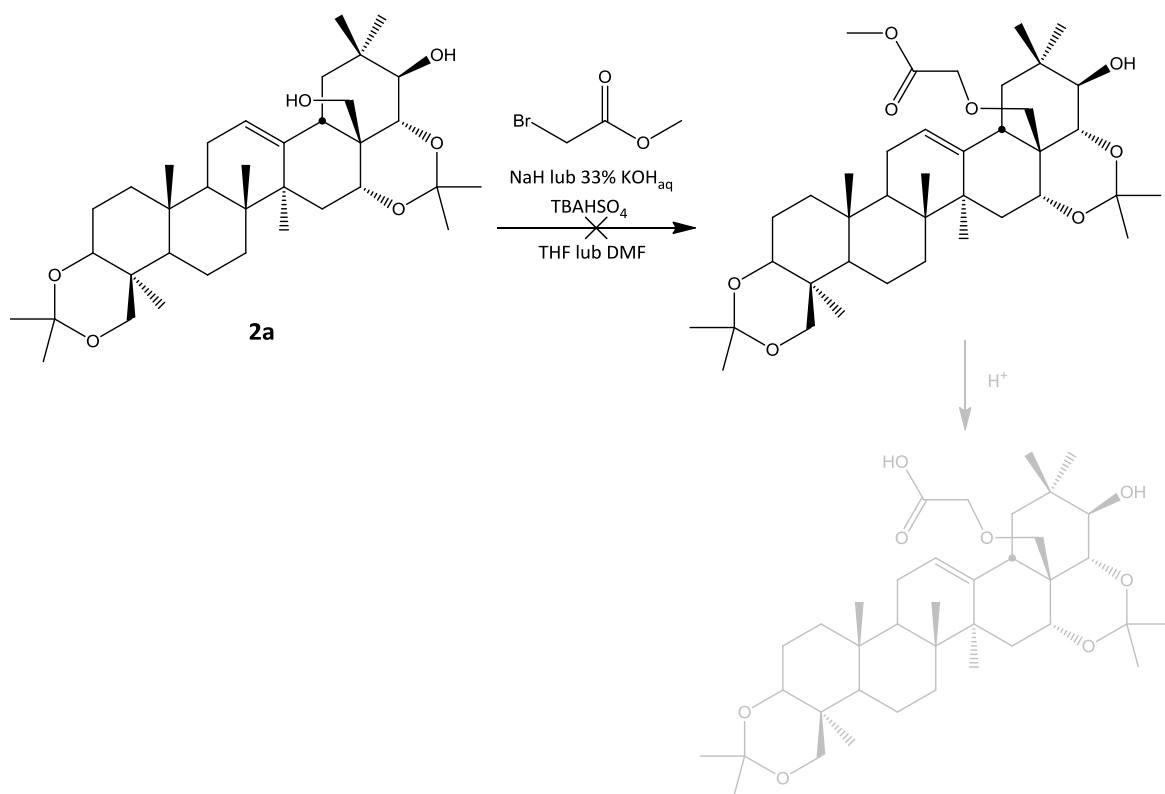


**Schemat 36.** Wykorzystanie modyfikowanych ftalimidów jak źródło grupy aminowej.

W świetle negatywnego wyniku reakcji utleniania, terminalną grupę karboksylową próbowano wprowadzić do związku **2a** poprzez przyłączenie grupy alkylkarboksylowej w reakcji z estrami kwasów  $\beta$ -halogenoalkylkarboksylowych, konkretnie z bromooctanem metylu (Schemat 37.). Stosując wodorek sodu w DMF substrat nie przereagował całkowicie mimo ogrzewania i dodatku kolejnych porcji reagentów, pojawia się kilka drobnych zanieczyszczeń. Rozdział mieszaniny metodami chromatograficznymi daje frakcje o niskiej czystości, nie pozwalającej na potwierdzenie struktury otrzymanych związków. Dla porównania wykonano próbę w warunkach PTC z bromooctanem



*tert*-butylu, jednakże nie było możliwe przereagowanie całości substratu ani uzyskanie frakcji o wystarczającej czystości. Prawdopodobnie uzyskanie oczekiwanego produktu nie jest możliwe w zastosowanych (dość silnie zasadowych) warunkach reakcji ze względu na rozpad bromooctanów.



**Schemat 37.** Wykorzystanie bromooctanu metylu jak źródła grupy karboksylowej.

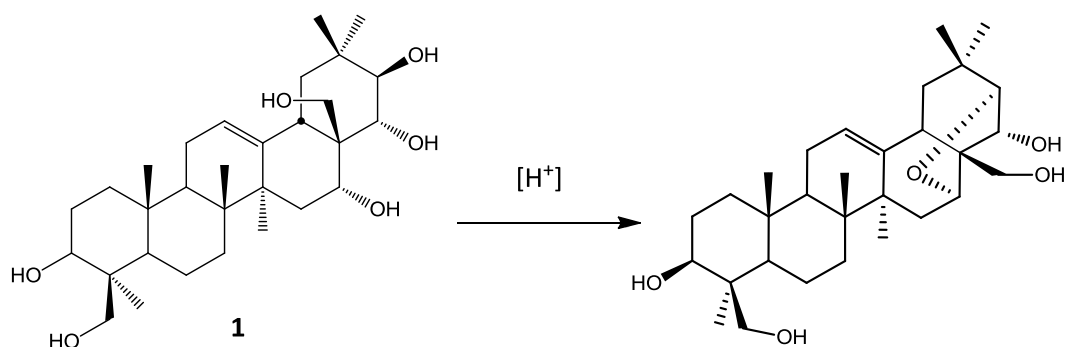
### 3.4.3 Próby wytworzenia układu 16,21-anhydro

Jedną z możliwych teoretycznie przemian grup hydroksylowych protoescygeniny jest dehydratacja prowadząca do tworzenia się mostków tlenowych (Schemat 38.). Taka modyfikacja z jednej strony stanowi zabezpieczenie grup hydroksylowych a z drugiej układ anhydro można ponownie rozpiąć dołączając dobrany odpowiednio fragment nukleofilowy. Mostek tego rodzaju znajduje się w escygeninie - jednym z aglikonów których wzorzec wyizolowano z mieszaniny powstałej po hydrolizie  $\beta$ -escyny. Jego ilość jest jednak tak niewielka, że pozyskiwanie jej w ten sposób do celów syntetycznych jest

kompletnie nieopłacalna czasowo i ekonomicznie. Dlatego podjęto próby otrzymania escygeniny z protoescygeniny przy użyciu takich odczynników jak m.in.:

- ✓ stężony kwas siarkowy(VI),
- ✓ kwas solny,
- ✓ kwas octowy, pTSA/kwas octowy lub HBr/kwas octowy,
- ✓ 2M HCl/EtOH,
- ✓ I<sub>2</sub>/PPh<sub>3</sub>,
- ✓ SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/imidazol.

Pierwsze dwa kwasy prowadzą do oczekiwanego produktu, jednak stopień przereagowania jest niski a ilość zanieczyszczeń bardzo duża. Reakcja z kwasem octowym daje wynik negatywny, dodanie katalitycznych ilości pTSA nie poprawiło stopnia przereagowania, natomiast dodatek HBr prowadzi do produktu znacznie mniej polarnego od escygeniny. Najlepszy efekt osiągnięto stosując etanol nasycony gazowym HCl (ok. 2M), substrat ulega wyczerpaniu przy czym powstaje przynajmniej siedem zanieczyszczeń o mniejszej polarności od escygeniny. Chromatograficzne oczyszczanie nie daje zadowalającego rezultatu, podobnie jak próby krystalizacji. Użycie jodu/PPh<sub>3</sub> oraz chlorku siarczyny prowadzi do rozkładu substratu.



**Schemat 38.** Zamknięcie pierścienia w protoescygeninie prowadzące do struktury escygeniny.

### 3.5 Badania strukturalne i fizykochemiczne.

Ze względu na aspekt technologiczny prowadzonych prac konieczne było przeprowadzenie diagnostyki polimorficznej dla podstawowego substratu syntezy oraz pochodnej najszerzej stosowanej – protoescygeniny (**1**) oraz dla 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenopochodnej (**2a**).

W największym uproszczeniu polimorfizm opisuje zjawisko występowania związków w różnych odmianach krystalograficznych, natomiast o pojęciu pseudopolimorfizmu mówimy, gdy substancja występuje w postaci solwatu z wodą lub innym rozpuszczalnikiem. Ponieważ istniała realna szansa, że otrzymane związki mogą tworzyć różne formy polimorficzne na etapach procesu technologicznego oraz późniejszego przechowywania, przeprowadzenie diagnostyki formy mogło potwierdzić bądź wykluczyć ryzyko pojawianie się form niepożądanych ze względów fizykochemicznych bądź farmakologicznych.

Zjawisko wielopostaciowości bada się stosując m.in. następujące techniki:

- ✓ rentgenowską dyfrakcyjną analizę strukturalną monokryształów i rentgenowską dyfrakcję proszkową (XRPD – X-ray Powder Diffraction),
- ✓ spektroskopię w podczerwieni (IR – Infrared Spectroscopy),
- ✓ różnicową kalorymetrię skaningową DSC (Differential Scanning Calorimetry) i spektroskopię Ramana
- ✓ do badań pseudo-polimorfizmu termogravimetrię (TGA – Thermogravimetric Analysis).

Protoescygeninę oraz 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoescygeninę do diagnostyki polimorficznej otrzymywano kilkoma zróżnicowanymi metodami:

- ✓ metodą krystalizacji z jednego lub dwóch rozpuszczalników (z powolnym obniżaniem temperatury);
- ✓ metodą wytrącania osadu jednym rozpuszczalnikiem z drugiego;
- ✓ metodą maceracji surowego osadu;
- ✓ metodą dyfuzyjną.

Przykładowe opisy eksperymentów znajdują się w części eksperymentalnej (podrozdziały 4.37 oraz 4.38).

Otrzymane próbki zostały poddane gruntownej analizie struktury i właściwości fizykochemicznych przez pracowników Zakładu Analityki Badawczej IF przy użyciu następujących metod:

- ✓ Spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)
- ✓ Analizy rentgenostrukturalnej (PRS-01)
- ✓ Rentgenowskiej dyfrakcji proszkowej (XRPD)
- ✓ Rentgenowskiej analizy rentgenostrukturalnej monokryształu
- ✓ Spektroskopii w podczerwieni (IR)
- ✓ Spektroskopii Ramana
- ✓ Skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC)
- ✓ Termograwimetrii (TGA)
- ✓ Mikroskopii optycznej
- ✓ Skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)
- ✓ Wolumetrycznej metody Karla Fischera oznaczania zawartości wody.

### *3.5.1 Analiza form polimorficznych protoescygeniny.*

Na podstawie kompleksowych badań wykazano obecność sześciu (oznaczonych jako I-VI) form polimorficznych protoescygeniny. Informacje dotyczące warunków otrzymywania próbek objętych analizą polimorficzną zestawiono w tabeli (Tabela 1).

**Tabela 1.** Warunki otrzymywania próbek protoescygeniny.

Nr	Forma	Skala [g]	Rozpuszczalnik, V[mL]	Przeciwozr. V [mL]	Warunki	Przemycie	Suszenie	Wyd. [%]	Czystość HPLC [%]
1	II	10,2	MeOH, 420	-	W, wrz. → L	MeOH	SP, 40°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	53,2	92,2
2	II	10,1	MeOH, 345	-	W, wrz. → RT → Z	MeOH	SP, 40°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	13,4	90,0
3	IV	5,2	MeOH, 130	-	W, wrz. → RT	AN	SP, 40°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	65,4	95,7
4	II	5,1	MeOH, 130	-	W, wrz. → RT	AN	SP, 40°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	54,9	94,1
5	II	0,50	MeOH, 21	-	W, wrz. → RT	MeOH	SP, 40°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	44,0	b.d.
6	VI	0,50	MeOH, 20	-	W, wrz. → RT	MeOH	SP, 56°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	46,0	b.d.
7	I	0,50	MeOH, 20	-	W, wrz. → RT	MeOH	SP, 56°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	42,0	b.d.
8	VI	2,0	MeOH, 65	MeOH	W, wrz. → RT	MeOH	SP, 60°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	55,0	b.d.
9	VI	2,0	MeOH, 65	MeOH	W, wrz. → RT	MeOH	SP, 60°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	50,0	b.d.
10	IV	0,025	EtOH, 2	Woda, 5	D, RT	-	Na powietrzu	-	b.d.
11	I	0,50	EtOH, 31	Woda, 19	W, wrz. → RT	EtOH-woda	SP, 40°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	66,0	b.d.
12	III	0,50	EtOH, 5	cHex, 22	W, wrz. → RT	cHex	SP, 40°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	66,0	b.d.
13	III	19,6	iPrOH, 200	cHex, 150	W, wrz. → RT	iPrOH-cHex	SP, 40 → 60°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	65,8	99,0
14	III	0,50	iPrOH, 7	cHex, 8	W, wrz. → RT	cHex	SP, 56°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	68,0	b.d.
15	III	0,50	iPrOH, 8	cHex, 13	W, wrz. → RT	cHex	SP, 56°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	74,0	b.d.
16	III	11,0	iPrOH, 136	cHex, 200	W, wrz. → RT	cHex	SP, 56°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	65,5	99,1
17	III	0,50	iPrOH, 9	cHex, 30	W, wrz. → RT	iPrOH- cHex	SP, 56°C, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	76,0	b.d.

AN – acetonitryl, cHex – cykloheksan; W – wytrącanie, D – metoda dyfuzyjna, wrz – w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, L – lodówka (ok. 4°C), Z – zamrażarka (ok. -15°C), RT – temperatura otoczenia (22–24°C), SP – suszarka próżniowa.

### 3.5.1.1 Analiza XRPD

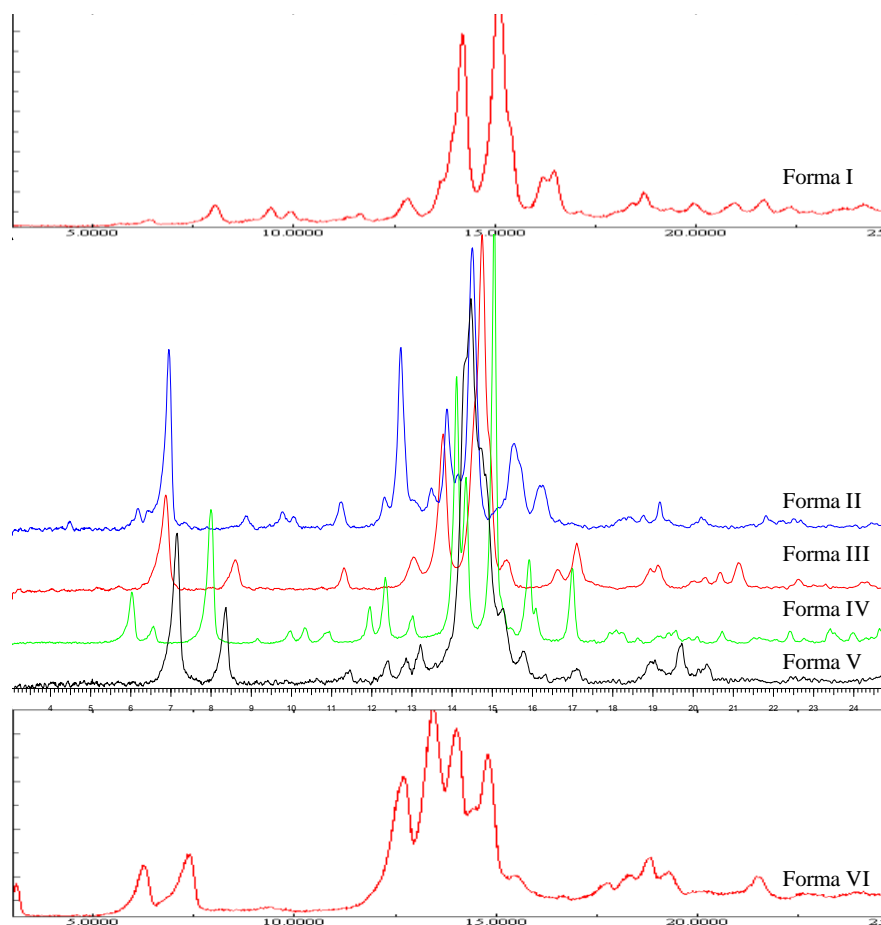
Przeprowadzone eksperymenty doprowadziły do ogólnego wniosku, że rentgenowska dyfrakcja proszkowa jest bardzo dobrą techniką pozwalającą na detekcję form krystalicznych polihydroksylowych trójtępenów (takich jak protoescygenina). Zakresem diagnostycznym dla analizowanych form jest zakres kątów odbicia  $2\theta$  od 3 do 25 stopni (Rys. 10.).

Dyfraktogramy dla formy I, II, III oraz VI charakteryzują się słabo rozdzielonymi, szerokimi i rozmytymi pikami, co spowodowane jest najprawdopodobniej małym rozmiarem krystalitów oraz obecnością składnika amorficznego.

Dla formy II przeprowadzono eksperymenty w wyższych temperaturach i opierając się dodatkowo na wynikach TGA oraz zawartości wody stwierdzono, że forma II jest hemihydratem (zawartość wody 1,75%).

Analiza dyfraktogramów formy III wskazuje na obecność zanieczyszczeń w części próbek. Z kolei w pomiarach w pętli temperaturowej ( $25^{\circ}\text{C} \rightarrow 110^{\circ}\text{C} \rightarrow 110^{\circ}\text{C}$  przez 30 min  $\rightarrow 25^{\circ}\text{C}$ ) zaobserwowano zmianę strukturalną. Powstała w ten sposób nową formę nazwano formą V, ogrzewanie powoduje ubytek masy (z 3,67% do 1,46%), co pozwala przypuszczać, że jest to hemihydrat.

Próbka 10 (Tabela 1., otrzymana z układu etanol/woda), którą scharakteryzowano jako formę IV wyróżniała się na tyle dobrą jakością kryształów by umożliwić wykonanie badań rentgenostrukturalnych (podrozdział 3.5.1.4).



**Rys. 10.** Zestawienie dyfraktogramów form polimorficznych: forma I (próbka 7), forma II (próbka 2), forma III (próbka 16), forma IV (próbka 10), forma V (próbka 16, 110°C), forma VI (próbka 6).

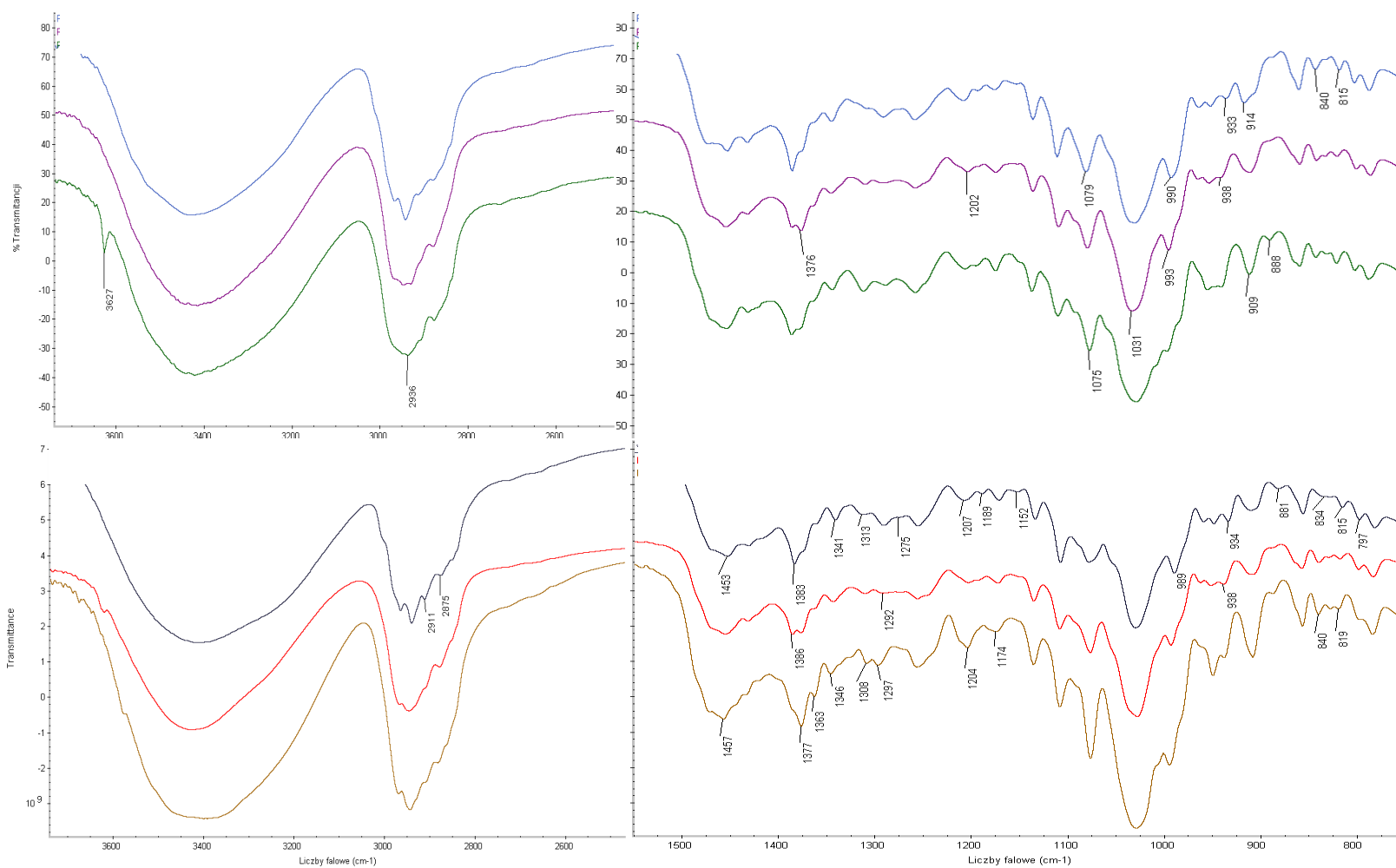
### 3.5.1.2 IR i spektroskopia Ramana

Zestawiając widma IR protoescygeniny w formach I – VI w zakresie diagnostycznym  $1500 - 400\text{cm}^{-1}$  zaobserwowano ich wysokie podobieństwo (Rys. 11.). Dodatkowo szerokie pasma na widmach znacznie utrudniają identyfikację form polimorficznych.

Widma próbek formy I, II oraz VI są zgodne z przewidywaniami.

W widmie próbek formy III i IV nie obserwowano pasm od zanieczyszczeń, które były widoczne na dyfraktogramach XRPD, co może świadczyć o niższej czułości metody IR w porównaniu do metody XRPD.

Termiczne przekształcenie formy III w formę V a następnie porównanie widm IR przed i po przemianie, gdzie nie zanotowano znaczących różnic, prowadzi ponownie do wniosku o mniejszej użyteczności spektroskopii IR w rozróżnianiu form polimorficznych tego typu związków.



**Rys. 11.** Zestawienie widm IR form polimorficznych (od góry): forma I (próbka 7), forma II (próbka 2), forma III (próbka 16), forma IV (próbka 10), forma V (próbka 16, 110°C), forma VI (próbka 6).

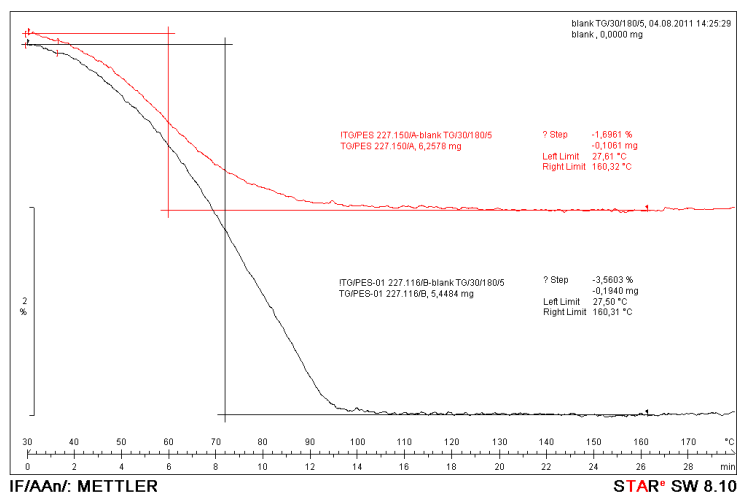


**Tabela 2.** Zestawienie charakterystycznych wartości pasm w widmie IR dla form protoescygeniny, [cm<sup>-1</sup>].

forma I	forma II	forma III	forma IV	forma V (110 °C)	forma VI
1079	1376	3627	2911	1386	1457
990	1202	2936	2876	1292	1377
933	1031	1075	1453	938	1363
914	993	909	1383		1345
		888	1341		1308
			1313		1297
			1275		1204
			1207		1174
			1189		819
			1152		
			881		
			834		
			797		

### 3.5.1.3 TGA i DSC

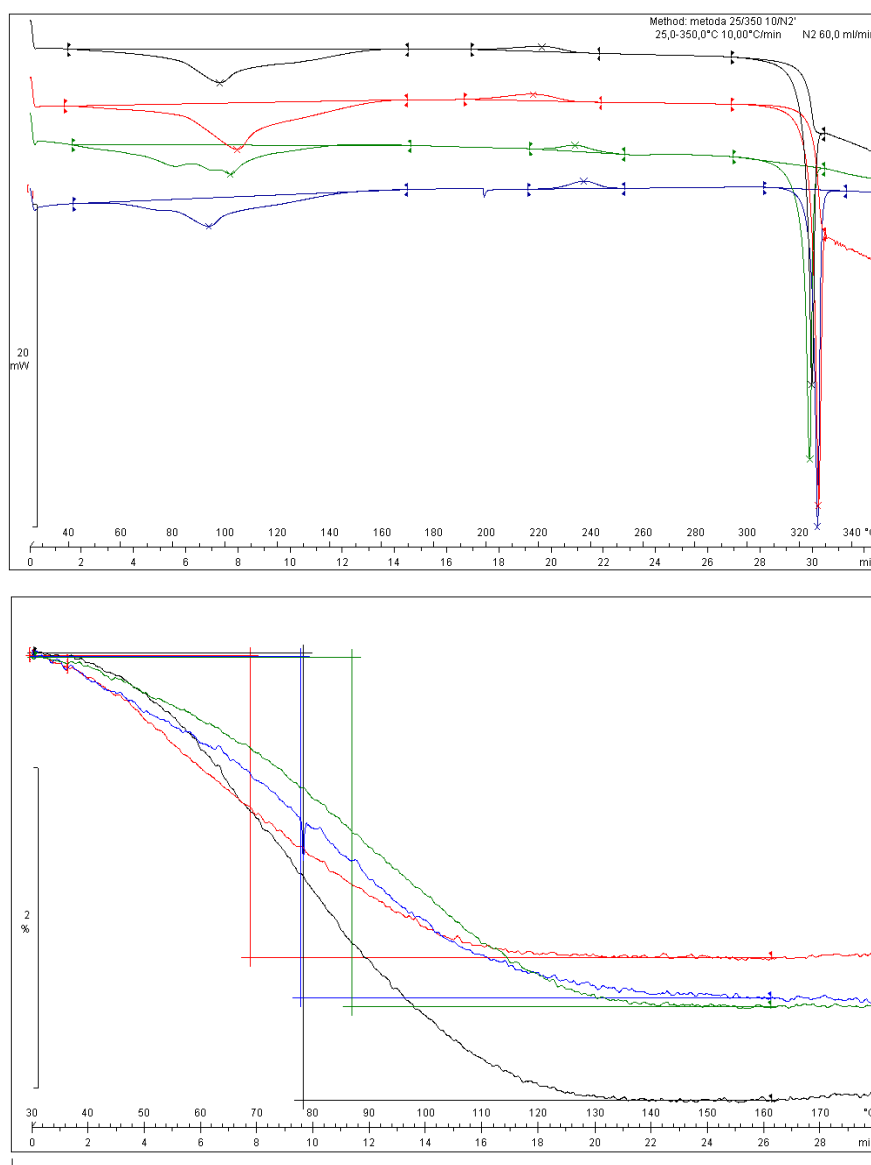
Na rysunku (Rys. 12.) zestawiono krzywe TGA próbek należących do formy I. Widoczne ubytki masy (zależnie od próbki 1,70% - 3,56%) związane są z odparowaniem rozpuszczalnika/wody.



**Rys. 12.** Zestawienie krzywych TGA próbek należących do formy I.

Na rysunku (Rys. 13., u góry) zestawiono krzywe DSC próbek należących do formy II. Zaobserwowano w tym przypadku dwa efekty endotermiczne oraz jeden egzotermiczny. Efekt widoczny w zakresie temperatur 40 - 160°C związany jest

z odparowaniem rozpuszczalnika. W zakresie temperatur 200 - 240°C widać efekt egzotermiczny związany z krystalizacją składnika amorficznego. W temperaturze ok. 220°C widać drugi efekt endotermiczny pochodzący od topnienia substancji z jednoczesnym rozkładem. Pomiar TGA wykonany do 400°C dla próbki 5 potwierdza rozkład substancji w zakresie temperatur topnienia (Rys. 13., u dołu).

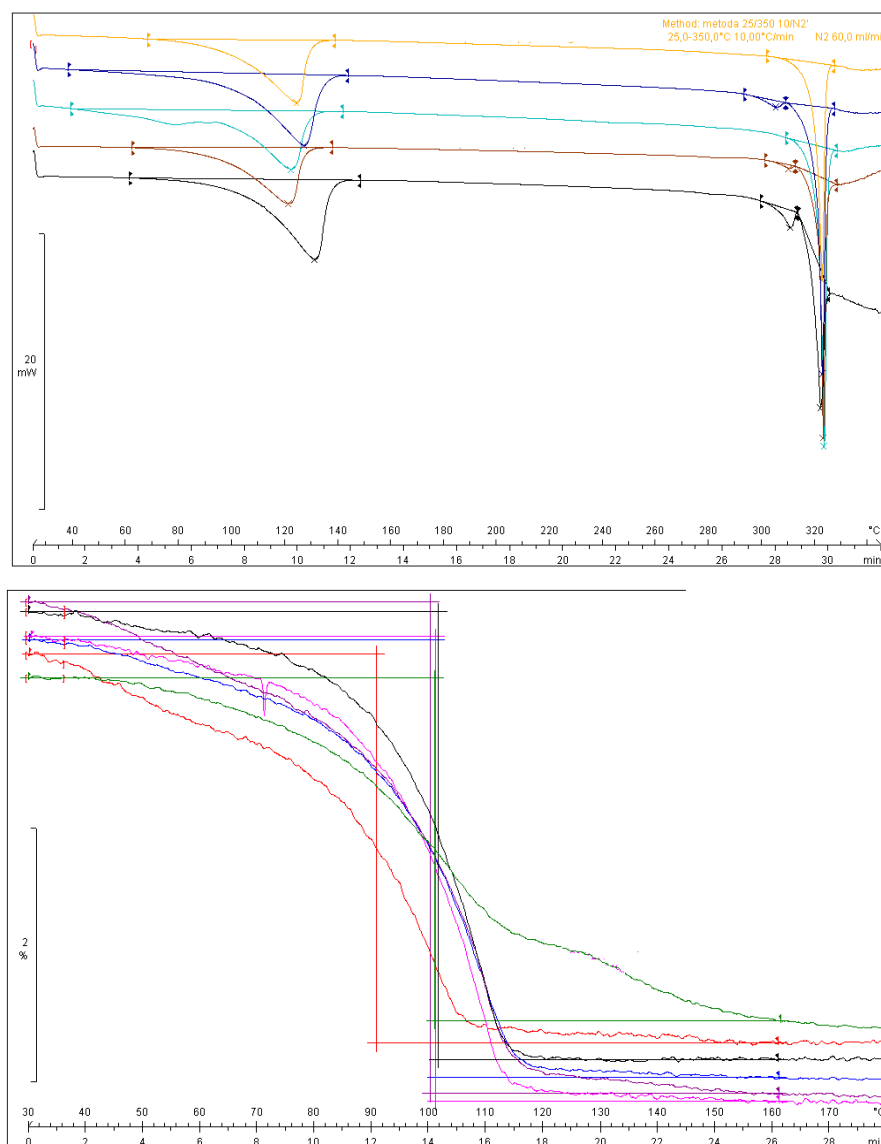


**Rys. 13** Zestawienie krzywych DSC oraz TGA próbek należących do formy II.

Ubytki masy zmierzone dla próbek formy II metodą TGA w temperaturze do 160°C wynoszą od 1,89% (próbka 5) do 3,52% (próbka 1), co świadczy o wyraźnej różnicy

w zawartości wody próbek otrzymywanych odmiennymi metodami (MeOH lub AN jako rozpuszczalnik, różna temperatura finalna wytrącania – lodówka lub RT).

Na rysunku (Rys. 14.) zestawiono krzywe DSC próbek należących do formy III. Widoczne są dwa lub trzy efekty endotermiczne. Pierwszy efekt w zakresie temperatur 40 - 140°C jest związany z odparowaniem rozpuszczalnika, efekt drugi w temperaturze ok. 305 - 310°C pochodzi najpewniej od topnienia zanieczyszczenia lub przemiany fazowej. Ponieważ pik występuje w obszarze temperatur rozkładu trudno jednoznacznie potwierdzić lub wykluczyć przemianę fazową. Trzeci efekt występujący przy ok. 322°C pochodzi od topnienia substancji z jednoczesnym rozkładem (potwierdzone pomiarem TGA wykonanym dla próbki 12 - Tabela 1.).

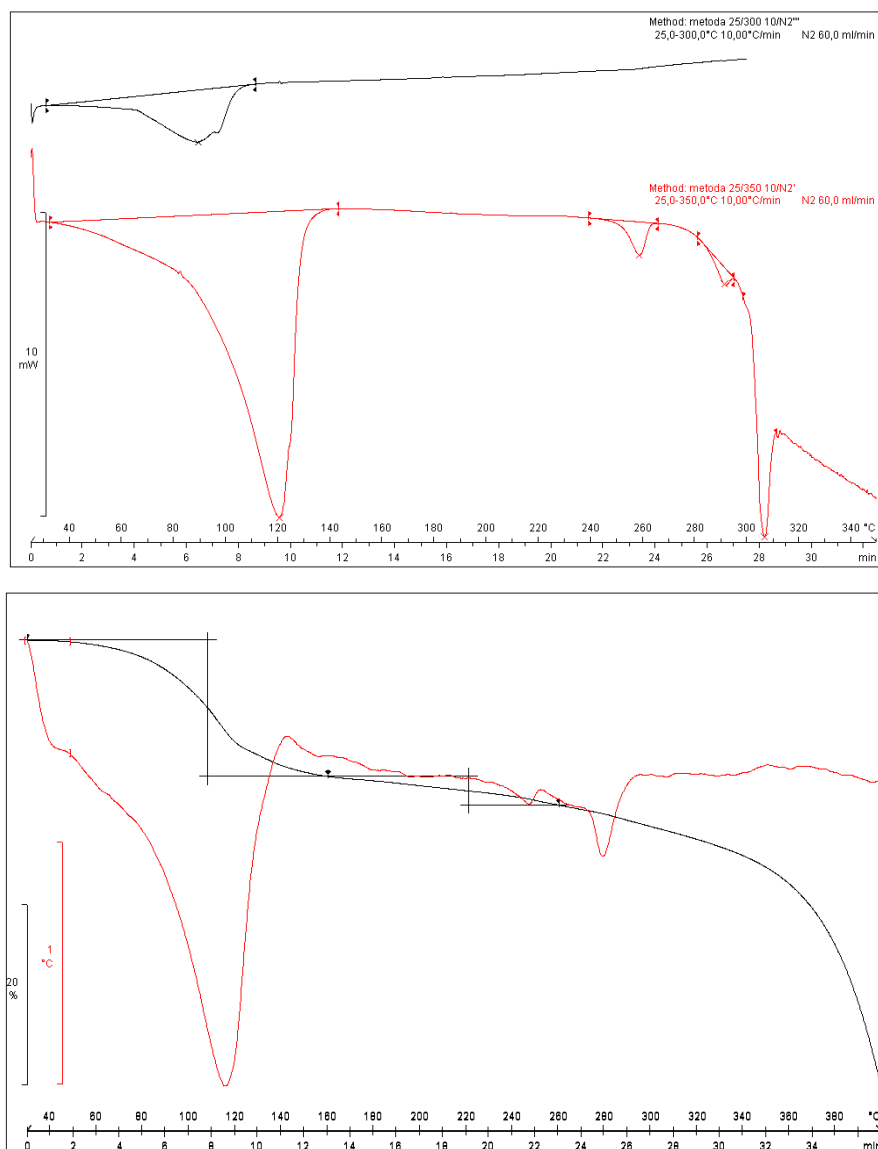


**Rys. 14.** Zestawienie krzywych DSC oraz TGA próbek należących do formy III.

Ubytki masy zmierzone metodą TGA do 160°C wynoszą od 3,06 % (próbka 15) do 3,89 % (próbka 17). Zawartości wody zmierzone metodą KF były zbieżne do wartości ubytków mas. Zgodność wyników analiz TGA i zawartości wody metodą KF oraz powtarzalność wyników dla różnych próbek pozwala sądzić, że forma III protoescygeniny jest monohydratem. Teoretyczna zawartość wody w monohydracie protoescygeniny wynosi 3,43 %.

Na rysunku (Rys. 15.) zestawiono krzywe DSC próbek należących do formy IV. Na krzywej DSC próbki 3 zarejestrowanej do 350°C widoczne są aż cztery efekty endotermiczne. Pierwszy z nich w zakresie 40 – 140°C pochodzi od odparowania wody,

drugi obserwowany przy ok. 259°C może pochodzić od topnienia zanieczyszczenia lub odparowania rozpuszczalnika, podobnie trzeci efekt przy ok. 291°C pochodzi najpewniej od topnienia zanieczyszczenia (obecność zanieczyszczenia potwierdzono metodą XRPD), natomiast czwarty efekt przy ok. 306°C pochodzi od topnienia substancji z rozkładem.

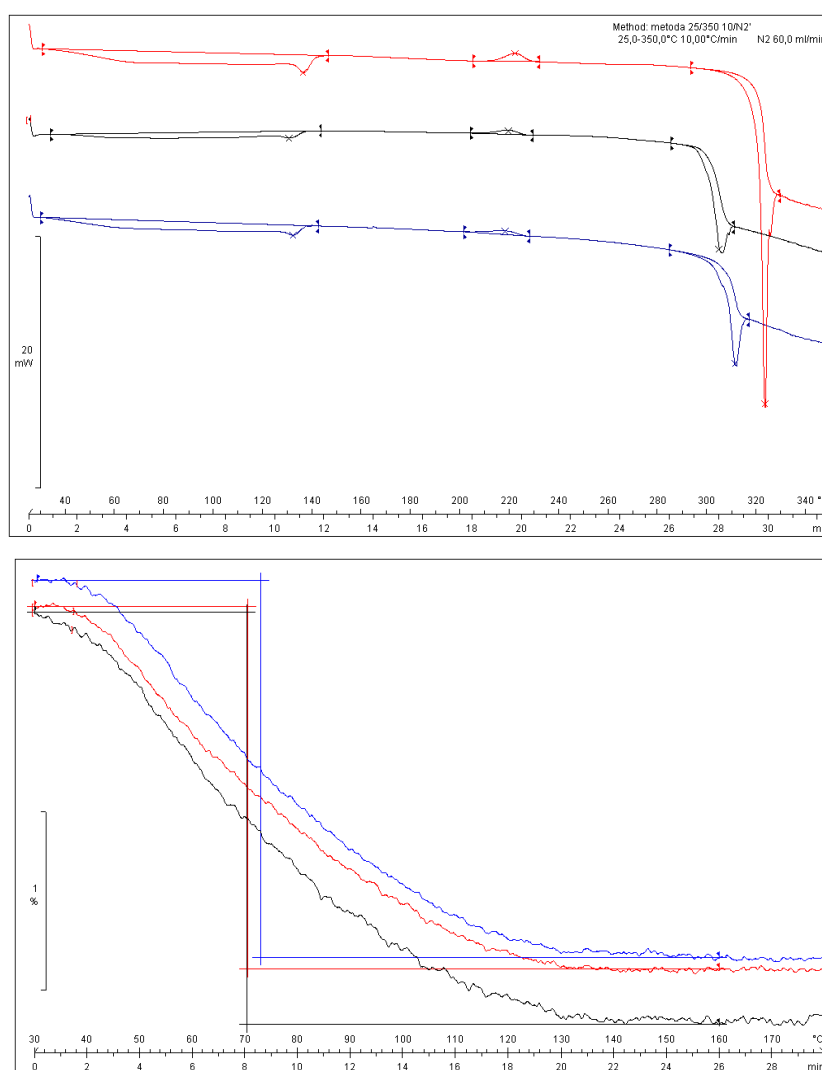


**Rys. 15.** Zestawienie krzywych DSC oraz TGA próbek należących do formy IV.

Ubytki mas dla obu próbek formy IV zmierzone metodą TGA do 160°C nie są zgodne. Dla próbki 10 wynosi on 9,94% i jest nieco mniejszy od teoretycznej zawartości wody w tris-sesquihydracie (4,5 hydracie) wynoszącej 11,07%. Większe wartości ubytków mas zmierzonych dla próbki 3 są spowodowane dodatkową obecnością rozpuszczalników

zaadsorbowanych i/lub obecnością krystalicznego zanieczyszczenia, które może być solwatem.

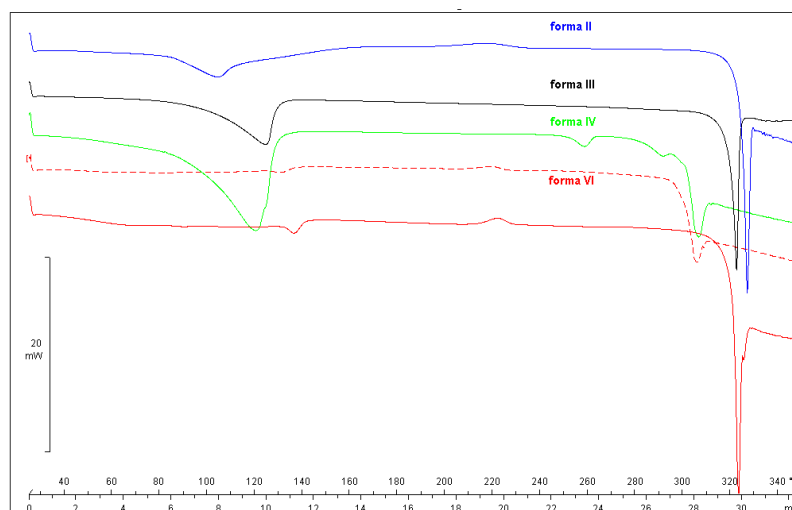
Na rysunku (Rys. 16.) zestawiono krzywe DSC próbek należących do formy VI. Tym razem widoczne są trzy efekty. Pierwszy efekt jest endotermiczny w zakresie temperatur 40 - 140°C związany jest z odparowaniem rozpuszczalnika. Następny efekt jest egzotermiczny w temperaturze ok. 220°C pochodzi od krystalizacji składnika amorficznego. Trzeci efekt w temperaturze ok. 300°C pochodzi od topnienia substancji z jednoczesnym rozkładem (potwierdzone pomiarem TGA dla próbki 8 do 400°C).



**Rys. 16.** Zestawienie krzywych DSC oraz TGA próbek należących do formy VI.

Ubytki masy zmierzone metodą TGA do 160°C wynoszą od 2,04% (próbka 6) do 2,32% (próbka 8). Zawartości wody zmierzone metodą KF w próbkach 8 i 9 są zbieżne do wartości ubytków mas.

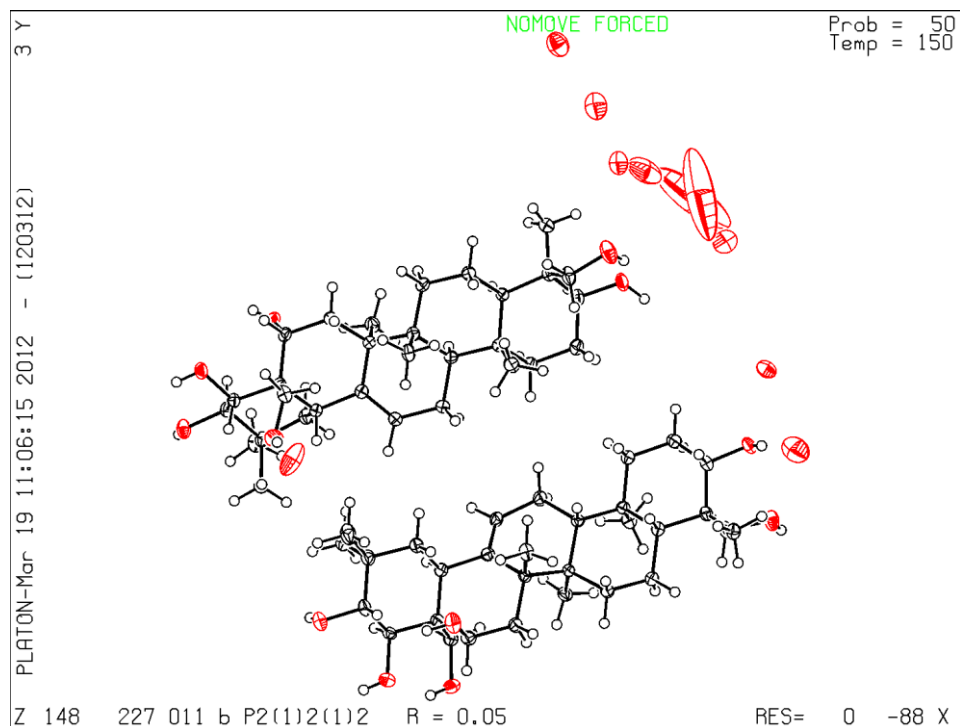
Na rysunku (Rys. 17.) porównano krzywe DSC form II, III, IV i VI. Efekty endotermiczne pochodzące od topnienia substancji występują w wąskim przedziale temperatur - od 300 do 330°C.



**Rys. 17.** Zestawienie krzywych DSC protoescygeniny – (od góry) formy II, III, IV i VI.

#### **3.5.1.4 Analiza rentgenostrukturalna monokryształu**

Jak już wspomniano próbka 10 (Tabela 1., otrzymana z układu etanol/woda), charakteryzowała się na tyle dobrą jakością kryształów, by umożliwić wykonanie badań rentgenostrukturalnych. Na rysunku (Rys. 18.) przedstawiono rysunek ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program) formy IV. Duże elipsoidy atomów tlenu wskazują na znaczną mobilność cząsteczek wody. Mimo niskiej temperatury pomiaru (-123,15°C) nie udało się zlokalizować atomów wodoru w cząsteczkach wody.



**Rys. 18.** Rysunek ORTEP formy IV protoescygeniny.

W tabeli (Tabela 3.) zestawiono podstawowe dane rentgenostrukturalne. Wyznaczone położenia atomów tlenu pochodzące od cząsteczek wody wskazują na obecność 3,5 cząsteczek wody przypadającą na cząsteczkę protoescygeniny. Forma IV krystalizuje w układzie rombowym w grupie przestrzennej  $P 2_12_12$ .

**Tabela 3.** Zestawienie uzyskanych danych rentgenostrukturalnych dla monokryształu formy IV.

Wzór sumaryczny	$C_{30} H_{50} O_6, 0.19(O_2), 3.11(O)$
Masa cząsteczkowa	562.70
Temperatura pomiaru	$-123,15^{\circ}C$
Długość fali	$1,54178 \text{ \AA}$
Układ krystalograficzny	rombowy
Grupa przestrzenna	$P 2_12_12$
Parametry komórki elementarnej	$[\text{\AA}]; a = 34,3121(6); b = 11,7219(2); c = 14,7946(3)$ $[^{\circ}]; \alpha = \beta = \gamma = 90$
Objętość komórki elementarnej	$5950,43(19) \text{ \AA}^3$
Liczba cząsteczek w komórce elementarnej	8
Gęstość (obliczona)	$1,256 \text{ Mg/m}^3$
Rozmiar kryształu	$0,65 \times 0,18 \times 0,12 \text{ mm}$
Zakres kątów $\theta$	$2,58 \text{ to } 68,03^{\circ}$
Zakresy wskaźników hkl	$-40 \leq h \leq 39, -13 \leq k \leq 10, -16 \leq l \leq 17$

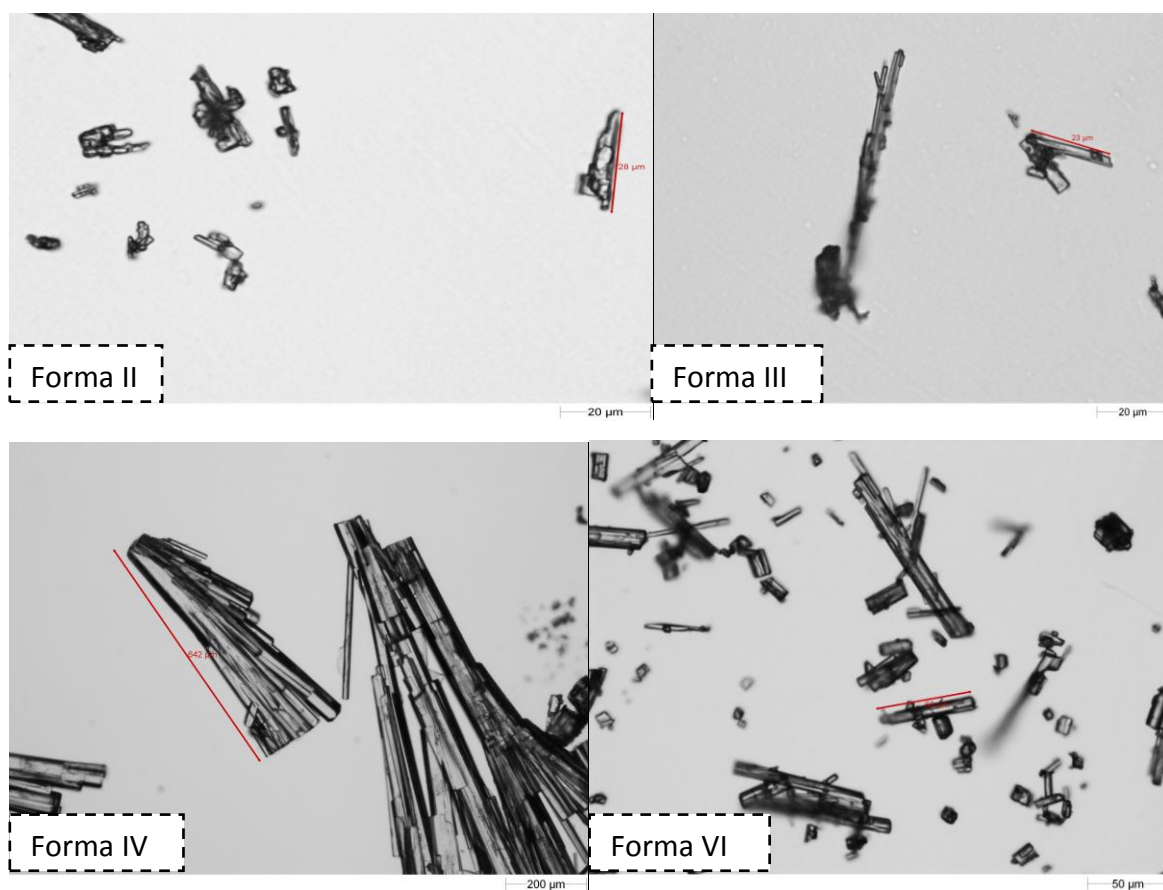


### 3.5.1.5 Ogląd mikroskopowy SEM

Wyniki oglądu mikroskopowego zestawiono w tabeli (Tabela 4.), zamieszczono także zdjęcia mikroskopowe badanych form polimorficznych (Rys. 19.).

**Tabela 4.** Wyniki oglądu mikroskopowego protoescygeniny.

Forma	Szacowana wielkość cząstek	Kształt cząstek
II	<50µm	małe cząstki o nieregularnym kształcie – grudki ; agregaty
III	<300µm	igły, małe cząstki o nieregularnym kształcie, blaszki; konglomeraty
IV	<1000µm	Igły, agregaty
VI	<300µm	igły, pokruszone igły; agregaty



**Rys. 19.** Zdjęcia mikroskopowe kryształów form polimorficznych protoescygeniny.

### 3.5.2 Analiza form polimorficznych 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny.

Na podstawie kompleksowych badań wykazano obecność dwóch form (oznaczonych jako A i B) 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny (**2a**). Informacje dotyczące warunków otrzymywania próbek objętych analizą polimorficzną zestawiono w tabeli (Tabela 5.).

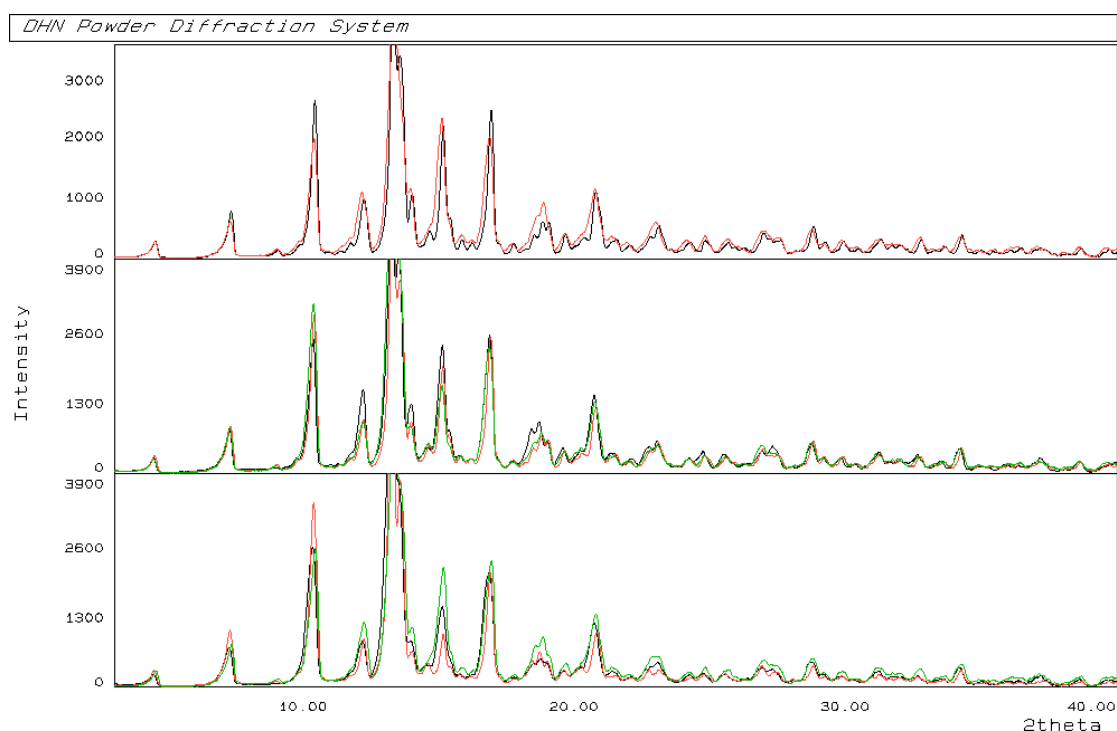
**Tabela 5.** Warunki otrzymywania próbek 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny.

Nr	Forma	Rozpuszczalnik [mL/g]	Wyd. [%]	Metoda	Temp. [°C]	Suszenie [°C]	HPLC [%]
1	A	Próbka wyjściowa					97,1
2	A	iPrOH, 4 + woda, 2	86,4	wytrącanie	wrz.	SP, 35	99,5
3	A	DMF, 20	58,8	krystalizacja	80	SP, 35→60→80	99,7
4	A	THF, 20 + woda, 2	91,6	wytrącanie	wrz.	SP, 35	99,6
5	B	AN, 40	85,6	maceracja 1h	wrz.	SP, 35→80	99,6
6	B	AN, 40	85,6	maceracja 1h	wrz.	SP, 35→80	b.d.
7	B	aceton, 40	75,8	maceracja 1h	wrz.	SP, 35	99,8
8	A	MTBE, 20	83,8	maceracja 1h	wrz.	SP, 35	99,4
9	B	heptan, 50	91,4	maceracja 1h	wrz.	SP, 35	99,3
10	B	cHex, 20	87,6	maceracja 1h	wrz.	SP, 35	98,9
11	B	cHex, 20	87,6	maceracja 1h	wrz.	SP, 35	b.d.
12	B	heptan, 40	91,7	maceracja 1h	wrz.	SP, 40	98,9
13	A	MTBE, 20	91,9	maceracja 1h 20min	wrz.	SP, 40	98,8
14	A	MTBE, 20	91,96	maceracja 1h 20min	wrz.	SP, 40	99,3

AN – acetonitryl, cHex – cykloheksan, MTBE – eter tert-butyloowo-metylowy; wrz. – w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, SP – suszarka próżniowa.

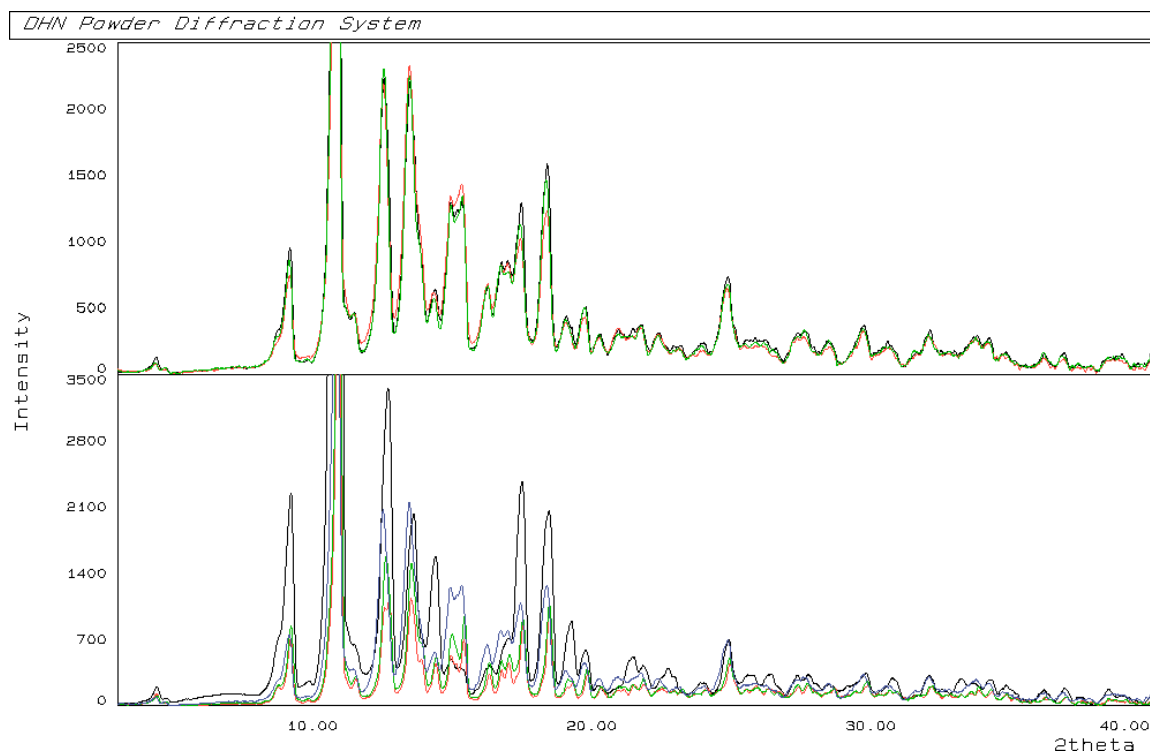
### 3.5.2.1 Analiza XRPD

Na rysunku (Rys. 20.) zestawiono dyfraktogramy próbek 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny, które są ze sobą zgodne, a zatem należą do tej samej formy krystalicznej A.



**Rys. 20.** Zestawienie dyfraktogramów próbek należących do formy A.

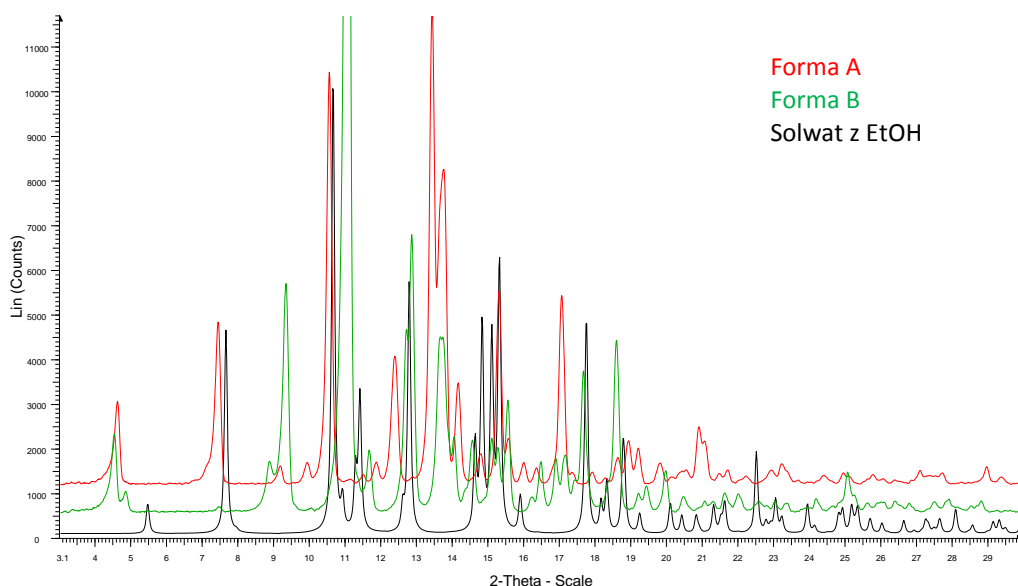
Na kolejnym rysunku (Rys. 21.) zestawiono dyfraktogramy próbek **2a** należących do wysokotopliwej (wt) oraz niskotopliwej (nt) formy B. Porównania dyfraktogramów próbek charakteryzujących się wysoką i niską temperaturą topnienia nie różnią się.



**Rys. 21.** Zestawienie dyfraktogramów próbek należących do wysokotopliwej oraz niskotopliwej formy B.

Należy w tym miejscu zwrócić uwagę, że dopiero porównując dyfraktogramy próbki 5 należącej do formy B(wt) oraz próbek 9, 10 oraz 12 należących do formy B(nt) (Tabela 5.), które zarejestrowano na dyfraktometrze D8 Discover z większą rozdzielczością, zauważalne są minimalne różnice. Różnice te polegają na wyższej intensywności niektórych pików występujących na zboczach i świadczą najpewniej o różnicach w wielkościach kryształitów a nie o różnej strukturze.

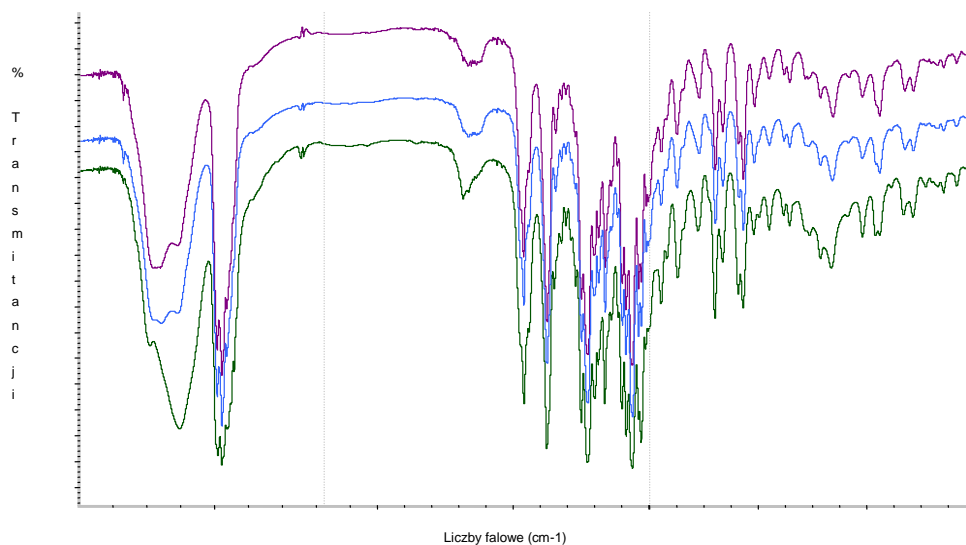
Porównano dyfraktogramy próbek należących do formy A, formy B oraz symulowanego dyfraktogramu proszkowego solwatu 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny z etanolem (Rys. 22.). Na tej podstawie stwierdzono, że rentgenowska dyfrakcja proszkowa jest dobrą techniką, która umożliwia detekcję form krystalicznych w zakresie diagnostycznym kątów odbicia.



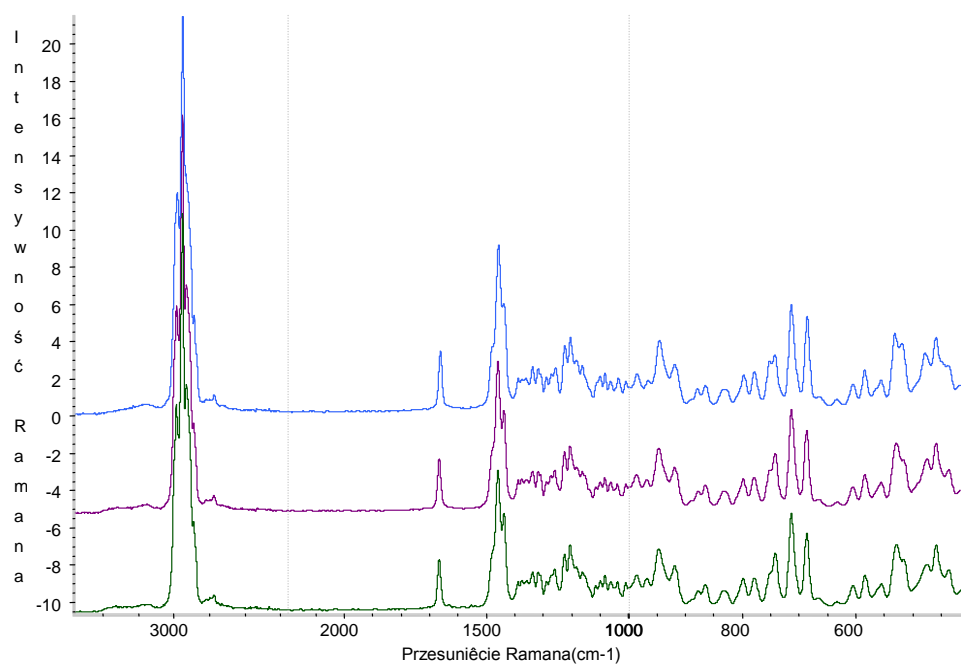
**Rys. 22.** Porównanie dyfraktogramów próbek należących do formy A oraz formy B do symulowanego dyfraktogramu solwatu (w zakresie kątów 3,5 - 21,5°).

### 3.5.2.2 Spektroskopia IR i Ramana

Widma IR oraz Ramana dla próbek należących do formy A są identyczne, podobnie widma próbek należących do formy B są tożsame. Z kolei różnice między tymi dwiema formami są wyraźne i charakterystyczne. Widma IR próbek form A i B wykazują największe różnice w następujących zakresach spektralnych: 3000 – 2800, 1400 – 1300, oraz 1020 – 990  $\text{cm}^{-1}$  (Rys. 23.). Natomiast widma Ramana wykazują największe różnice w zakresie 3100 – 2800  $\text{cm}^{-1}$  (Rys. 24.). Analiza widm IR i Ramana próbek formy B o wysokiej i niskiej temperaturze topnienia nie wykazała różnic między nimi. Dlatego próbki zanalizowano rejestrując widmo IR techniką ATR oraz wykonując widma IR w nujolu. Oba te eksperymenty uwidoczniły dodatek zanieczyszczenia w próbce 7, lecz nie różnicowały widm IR formy niskotopliwej i wysokotopliwej.



**Rys. 23.** Porównanie widm IR próbek należących (od góry) do formy B(nt), B(wt) oraz formy A.

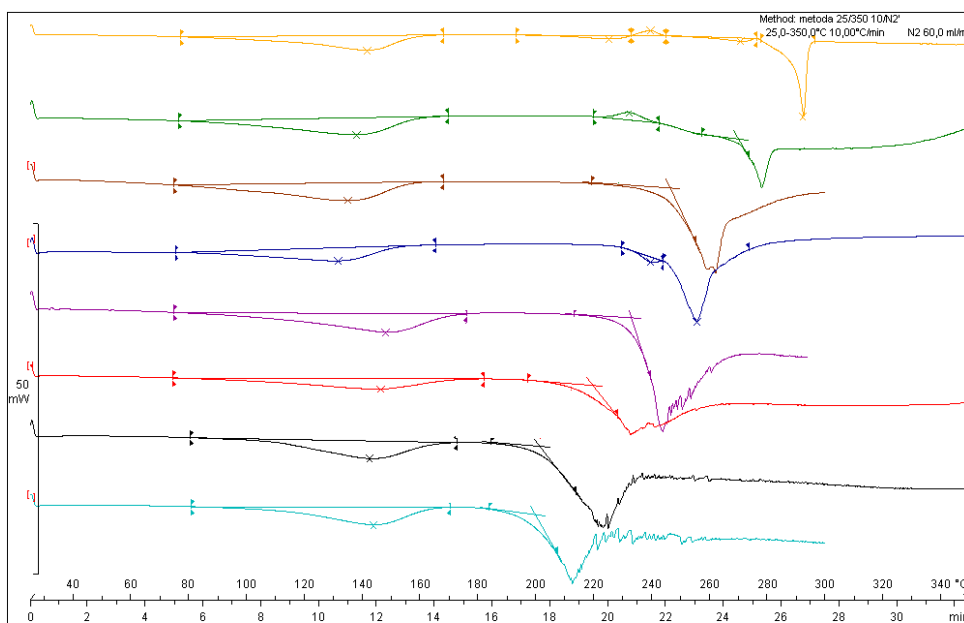


**Rys. 24.** Porównanie widm Ramana próbek należących (od góry) do formy B(nt), B(wt) oraz formy A.

### 3.5.2.3 TGA i DSC

Krzywe DSC formy A (Rys. 25.) charakteryzują się szerokim efektem endotermicznym w zakresie temperatur 80 - 170°C, pochodzącym od odparowania rozpuszczalników oraz efektem endotermicznym pochodzącym od topnienia substancji. Temperatura topnienia wyznaczona wg onsetu wynosi od 199,66 do 269,72°C, podczas

gdy dla dwóch próbek ze względu na nakładające się efekty temperaturę topnienia wyznaczono wg pików i wynoszą one 254,98 oraz 291,73°C. Powodem występowania tak szerokiego zakresu temperatur topnienia jest różna czystość chemiczna analizowanych próbek - temperatura topnienia przesuwa się w kierunku niższych temperatur wraz z pogarszającą się czystością. Forma A topi się z rozkładem, o czym świadczą zaburzenia linii bazowej występujące za efektem topnienia.

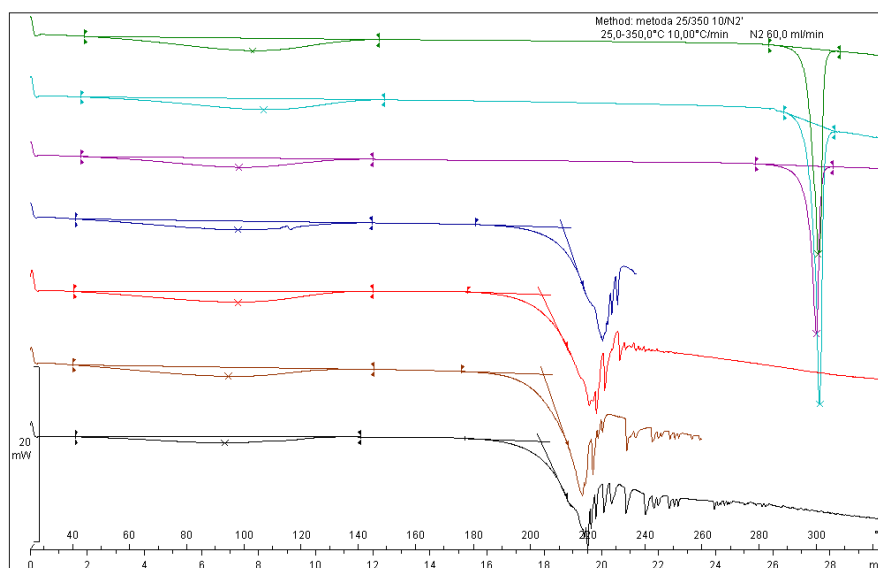


**Rys. 25.** Zestawienie krzywych DSC próbek należących do formy A.

Porównując wartości ubytków mas z zawartością wody oznaczoną metodą KF zaobserwowano wyraźną rozbieżność tych wartości. Analiza XRPD oraz IR wykazała, że wszystkie próbki należą do tej samej formy krystalicznej, a zatem różnice w wartościach są spowodowane obecnością innych zaadsorbowanych rozpuszczalników. Przypuszcza się, że forma A jest hemihydratem (wartość stechiometryczna wody 1,51%) lub monohydratem (wartość stechiometryczna wody 2,98%).

Krzywe DSC formy B (Rys. 26.) charakteryzują się szerokim efektem endotermicznym w zakresie temperatur 40 - 140°C pochodzącym od odparowania rozpuszczalników oraz efektem endotermicznym pochodzącym od topnienia substancji. Temperatura topnienia dla formy B(nt) wyznaczona wg onsetu wynosi od 203,43 do 211,10°C, z kolei dla formy B(wt) 296,25 do 297,50°C. Substancja topi się z rozkładem,

o czym świadczą zaburzenia linii bazowej za efektem topnienia. Przypuszcza się, że również w przypadku próbek należących do formy B jednym z powodów występowania szerokiego zakresu temperatur topnienia jest różna czystość chemiczna analizowanych próbek - temperatura topnienia przesuwają się w kierunku niższych temperatur wraz z gorszą czystością próbki.



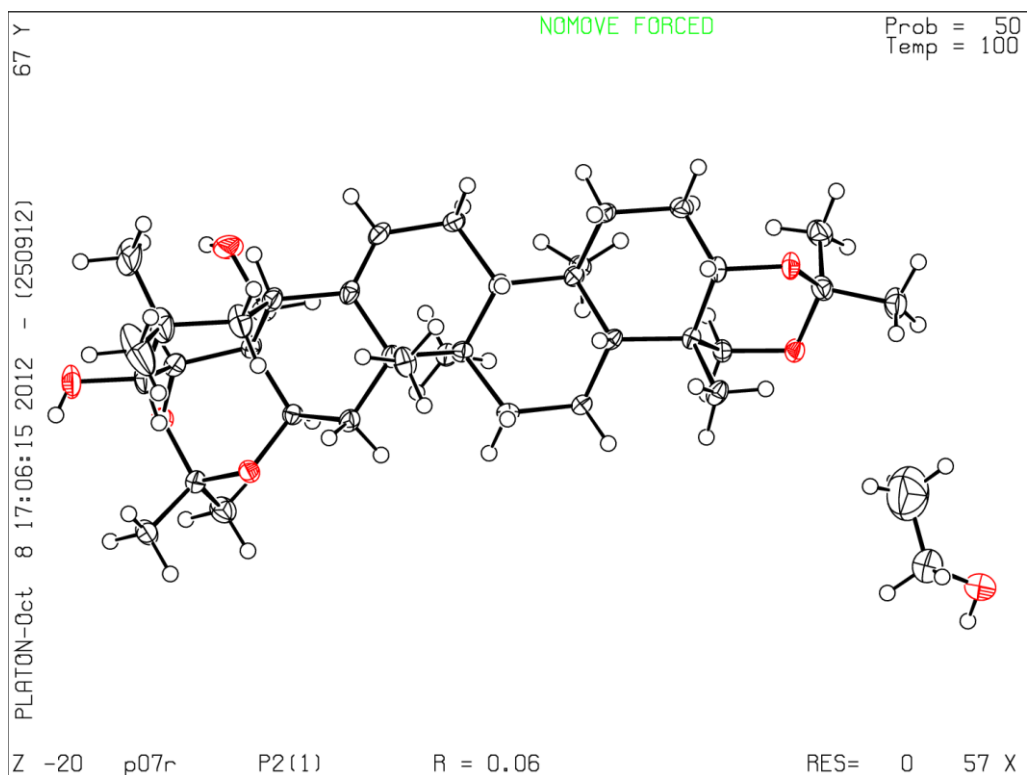
**Rys. 26.** Zestawienie krzywych DSC próbek należących do formy B(wt) – 3 górne krzywe oraz B(nt) – 4 dolne krzywe.

Ponownie zauważalna jest zbieżność wartości ubytków mas z wartościami zawartości wody. Wartości te wynoszą od 2 do 3%. Przypuszcza się, że forma B jest hemihydratem (wartość stechiometryczna wody 1,51%) lub monohydratem (wartość stechiometryczna wody 2,98%).

#### 3.5.2.4 Analiza rentgenostrukturalna solwatu z etanolem

Na rysunku (Rys. 27.) przedstawiono rysunek ORTEP solwatu 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny z etanolem. Z kolei w tabeli (Tabela 6.) zestawiono uzyskane dane rentgenostrukturalne.





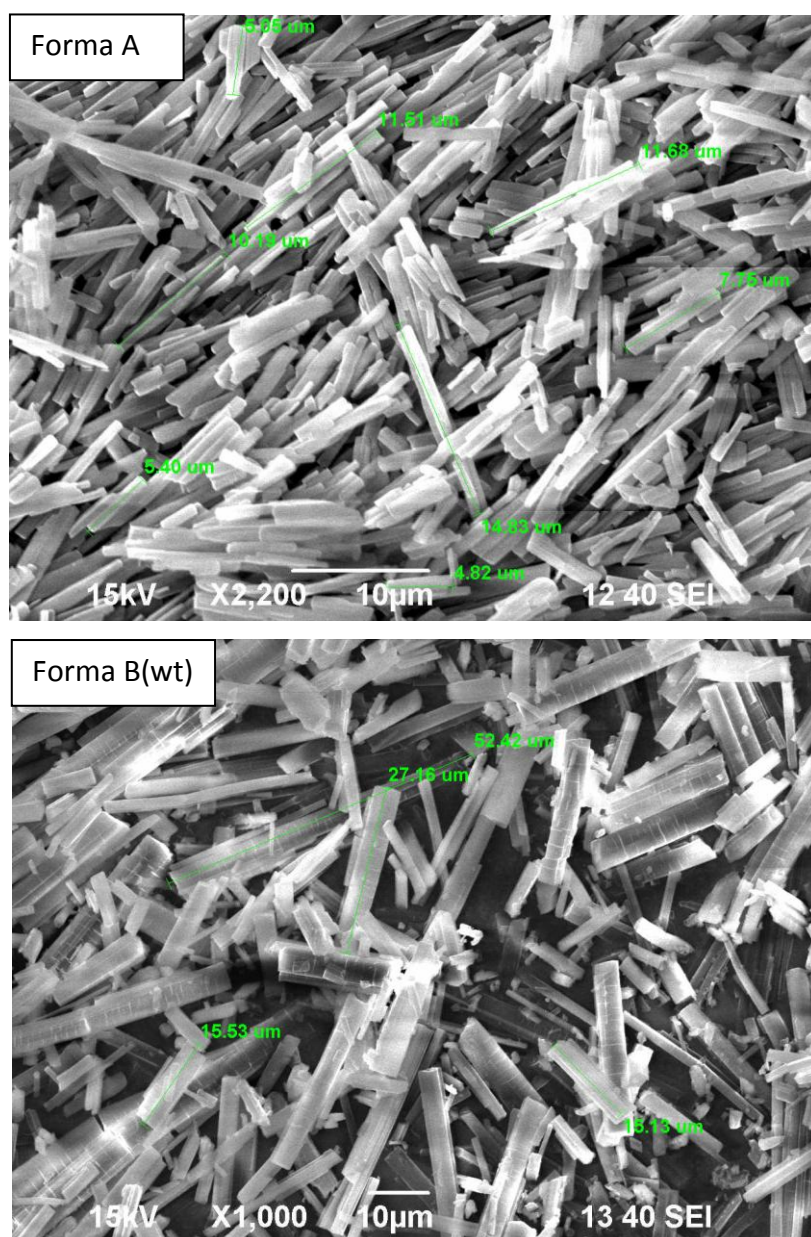
**Rys. 27.** Rysunek ORTEP solwatu z etanolem.

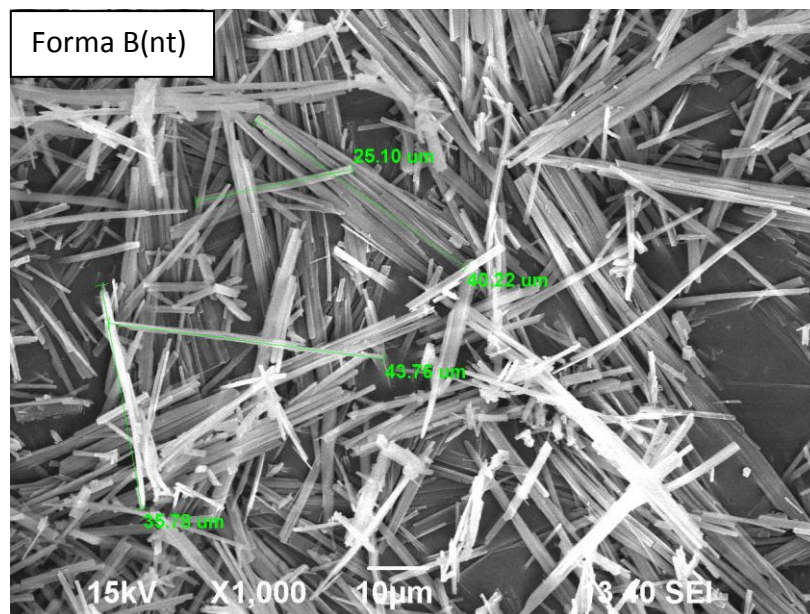
**Tabela 6.** Zestawienie danych rentgenostrukturalnych dla solwatu z etanolem.

Wzór sumaryczny	C <sub>38</sub> H <sub>64</sub> O <sub>7</sub>
Masa cząsteczkowa	632,89
Temperatura pomiaru	100(2) K
Długość fali	0,71073 Å
Układ krystalograficzny	jednoskośny
Grupa przestrzenna	P 2 <sub>1</sub>
Parametry komórki elementarnej	[Å]; a=12,1296(5); b=8,8316(3); c=16,9970(7) [°]; α=γ=90, β=107,587(4)
Objętość komórki elementarnej	1735,68(12) Å <sup>3</sup>
Liczba cząsteczek w komórce elementarnej	2
Gęstość (obliczona)	1,211 Mg/m <sup>3</sup>
Rozmiar kryształu	0,30 x 0,10 x 0,10 mm
Zakres kątów θ	od 1,76 do 26,37°
Zakresy wskaźników hkl	-15<=h<=15, -11<=k<=11, -21<=l<=21

### 3.5.2.5 Ogląd mikroskopowy SEM

Analiza SEM próbek formy A, formy B(wt) oraz formy B(nt) wykazała, że kryształy wszystkich analizowanych form mają kształt wydłużony (Rys. 28.). Kryształy próbki formy A mają powierzchnię gładką. Próbkę kryształów należących do formy B(wt) mają krawędzie zaokrąglone, gładkie, widoczne są także pęknięcia. Natomiast kryształy formy B(nt) mają krawędzie kanciaste i są cieńsze od kryształów formy B(wt).





**Rys. 28.** Ogląd mikroskopowy SEM kryształów form polimorficznych 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-  
protoescygeniny.

## 4 Część eksperymentalna

### STOSOWANE METODY BADAWCZE:

Do eksperymentów używano monohydratu protoescygeniny (w przepisach dla uproszczenia – protoescygenina **1**) wytworzonej w Instytucie Farmaceutycznym z handlowo dostępnej  $\beta$ -escyny (Nobilus Ent.).

#### *Metody chromatograficzne*

Chromatografię cienkowarstwową (TLC) wykonywano na płytkach z folii aluminiowej pokrytej żelalem krzemionkowym 60 F254. Detekcja była dokonywana za pomocą lampy UV ( $\lambda = 254$  lub  $365$  nm) lub po spryskaniu wywoływaczem molibdenowo-cerowym i wypaleniu w temp. ok.  $200^{\circ}\text{C}$ . Do chromatografii kolumnowej używano żelu krzemionkowego 60 firmy Merck.

Oznaczenia czystości metodą szybkiej chromatografii cieczowej (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) wykonywano stosując chromatograf cieczowy UHPLC Dionex Ultimate 3000, wyposażony w detektor PDA.

#### *Spektrometria masowa (MS oraz HRMS)*

Analizę masową wykonywano na aparacie Applied Biosystems Qtrap 3200 ze źródłem jonów ESI, stosując 0,1% octanu amonu w MeOH jako rozcieńczalnik, przy stężeniach próbki 0,1 mg/mL.

#### *Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)*

Widma  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR zostały wykonane w większości przypadków w DMSO przy temperaturze 298K z użyciem aparatu Varian-NMR-vnmrs600 wyposażonego w sondę odwróconą 600 MHz PFG Auto XID ( $1\text{H}/^{15}\text{N}-^{31}\text{P}$  5 mm). Celem potwierdzenia struktury badanych związków wykonano również widma 2D: COSY,  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  g-HSQC i modyfikowane g-HMBC. Do rejestracji użyto standartowych sekwencji pulsowych dostarczonych w pakiecie ChemPack 4.1. Widma  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR były kalibrowane względem przesunięć chemicznych  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  TMS dla którego  $\delta = 0,0$  ppm. Stężenie badanych związków w roztworze wynosiło około 20 mg w 0,6 mL.

### *Rentgenowska dyfrakcja proszkowa (XRPD)*

Rentgenowskie pomiary wykonano na dyfraktometrach proszkowych MiniFlex firmy Rigaku oraz D8 Discover firmy Bruker, przy następujących parametrach:

Promieniowane:  $\text{CuK}\alpha 1$ ,  $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$

Zakres skanowania  $2\theta$ : od  $3$  do  $40^\circ$

Krok pomiaru:  $0,02^\circ$ , D8 Discover:  $0,01^\circ$

Szybkość zliczania:  $0,5^\circ/\text{min}$ , D8 Discover:  $2^\circ/\text{min}$

Detektor: licznik scyntylicyjny, D8 Discover: licznik pozycyjnie czuły Vantec z oknem pomiarowym  $6^\circ$ .

Przygotowanie próbek: próbki ujednoludniono poprzez delikatnie roztarcie w moździerzu. Następnie nałożono na nośnik próbek i wyrównano powierzchnię.

### *Rentgenowska analiza rentgenostrukturalna monokryształu*

Pomiary strukturalne na monokryształach protoescygeniny zostały wykonane na dyfraktometrze firmy Bruker AXS z czytnikiem pozycyjnie czułym typu APEX II, z przystawką niskotemperaturową OXFORD CRYOSYSTEMS, dla promieniowania  $\text{CuK}\alpha$ . Pomiary wykonano w Instytucie Chemii Organicznej PAN w pracowni krystalograficznej prof. dr hab. Zofii Lipkowskiej.

Pomiary strukturalne na monokryształach 3,24;22,28-di-O,O-izopropylidenoproteoescygeniny (**2a**) wykonane zostały na czteroosiowym dyfraktometrze monokrystalicznym  $\kappa$ -axis KM4CCD z przystawką niskotemperaturową OXFORD CRYOSYSTEMS, dla promieniowania  $\text{MoCuK}\alpha$ , Zebrano 552 ramki w interwałach, co  $1^\circ$ , z czasem zliczania 40 s.

Pomiary wykonano w Laboratorium Krystalochemii Wydziału Chemii UW kierowanym przez prof. dr hab. Krzysztofa Woźniaka.

### *Spektroskopia w podczerwieni (IR)*

Widma IR wykonano na aparacie Nicolet iS10 firmy Thermo Scientific w zakresie  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$  z rozdzielczością  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Dla każdej metody do analizy jednej próbki zbierano 16 skanów. Widma wykonano trzema metodami:

- 1) prasowanej tabletki z KBr (ok. 200 mg KBr/1,5 mg substancji),
- 2) w nujolu (ciekła parafina),

3) ATR (ang. Attenuated Total Reflectance, metoda osłabionego odbicia całkowitego), którą wykonano na kryształach diamentowym.

#### *Spektroskopia Ramana*

Widma Ramana wykonano na aparacie Nicolet NXR 9650 firmy Thermo Scientific z laserem 1064nm Nd:YVO<sub>4</sub>. Widma wykonano przy mocy lasera 1 W, średnicy wiązki lasera 50 μm, w zakresie 3700-150 cm<sup>-1</sup> z rozdzielczością 8 cm<sup>-1</sup> zbierając po 64 skanów.

#### *Kalorymetria skaningowa (DSC)*

Pomiary DSC wykonano z zastosowaniem celi pomiarowej DSC822e firmy Mettler Toledo, przy następujących warunkach:

Rodzaj tygla: aluminiowy, pojemność 40 μL,

Atmosfera pomiaru: N<sub>2</sub>, przepływ 60 mL/min,

Metodyka pomiaru: próbki ogrzewano w reżimie dynamicznym od 25 do 350°C z prędkością 10°C/min,\*

Przygotowanie próbek: odważano od 5 do 10 mg substancji i umieszczano w tyglach bez uprzedniego przygotowania. Tygle hermetycznie sprasowano, a przed pomiarem nakłuto.

\*Wstępne pomiary **1** wykonano do 180 i 300°C charakterystyka krzywych DSC wskazywała na odparowanie wody z jednoczesnym topnieniem i stopniową degradacją. Niestety była to zła interpretacja. Dlatego dla próbek, których pozostała wystarczająca ilość ponownie wykonano pomiary do 350°C.

#### *Termograwimetria (TGA)*

Pomiary termograwimetryczne wykonano z zastosowaniem celi pomiarowej TGA/SDTA851e firmy Mettler Toledo, przy następujących warunkach: rodzaj tygla - aluminiowy, pojemność 40 μL i 100 μL (wybrane próbki); atmosfera pomiaru - N<sub>2</sub>, przepływ 60 mL/min; metodyka pomiaru - próbki ogrzewano od 30 do 180°C z prędkością 5°C/min (**1**), od 30 do 300°C z prędkością 10°C/min (**2a**) oraz od 30 do 400°C z prędkością 10°C/min (wybrane próbki); przygotowanie próbek - odważono od 5 do 10 mg substancji i umieszczono w tyglach bez uprzedniego przygotowania. Tygle hermetycznie sprasowano, a przed pomiarem nakłuto. W pomiarach uwzględniono poprawkę na pusty tygiel.

Na zamieszczonych rysunkach zestawiono krzywe: TGA (linia czarna) i SDTA (linia czerwona). Krzywa TGA pokazuje zmiany masy próbki w funkcji temperatury bądź czasu. Natomiast na krzywej różnicowej SDTA (Single Differential Thermal Analysis) widoczne są efekty związane zarówno z odparowaniem rozpuszczalnika jak i topieniem substancji.

#### *Ogląd mikroskopowy*

Pomiary kształtu cząstek wykonano z zastosowaniem automatycznego mikroskopowego analizatora Morphology G3s f. Malvern. Pomiar wykonano w świetle diaskopowym przy powiększeniu 2,5x; 5x; 10x; 20x; 50x z zastosowaniem kompensacji położenia stolika pomiarowego. Ogląd mikroskopowy cząstek wykonano bez zastosowania ultradźwięków.

#### *Ogląd za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM)*

Badania wykonano w Laboratorium Badawczym POLMATIN przez dr Anetę Łukomską przy zastosowaniu skaningowego mikroskopu elektronowego firmy JEOL typ JSM 64-90LV (Japonia), wg procedury badawczej PB-04/NB-5/2010 wyd. 3 z dnia 29.10.2010r. (badania objęte zakresem akredytacji – laboratorium o kodzie AB113, Norma PN-EN ISO/IEC 17025).

#### *Oznaczenie zawartości wody wolumetryczną metodą Karla Fischera*

Oznaczanie wody metodą Karla Fischera wykonano na aparacie 701 KF Titrino firmy Metrohm.

Naważka: 100 - 150 mg **(1)**; 80 - 100 mg **(2a)**

Elektroda: Methrom 6.0338.100

Rozpuszczalnik: Metanol suchy (Hydranal®) **(1)**

Ksilen (Hydranal®) : metanol suchy (Hydranal®) 25:10 **(2a)**

Chloroform do spektroskopii : metanol suchy (Hydranal®) 3:1 **(2a)**

Titrant: Composite 5 (Hydranal®)

## OPISY EKSPERYMENTÓW:

### *4.1 Otrzymywanie protoescygeniny (1) z $\beta$ -escyny*

*[Metoda opracowana w skali laboratoryjnej i zoptymalizowana do skali 3kg substratu]*

W 50 L reaktorze wyposażonym w mieszadło mechaniczne, termometr i chłodnicę zwrotną umieszczono  $\beta$ -escynę (3,0 kg) i rozpuszczono w metanolu (11,85 kg). Do mieszaniny reakcyjnej dodano powoli roztwór kwasu siarkowego(VI) (95%,  $d = 1,84 \text{ kg/L}$ , 1,20 kg) w metanolu (1,20 kg) cały czas mieszając, następnie ogrzewano w 67-68°C przez 100 godzin. Po ochłodzeniu dodano metanolowy roztwór wodorotlenku sodu (30%, 2,28 kg), ogrzano do 70-72°C i kontynuowano ogrzewanie przez 1 godzinę, następnie wyłączono ogrzewanie, mieszano przez 2 godziny i pozostawiono w temperaturze otoczenia bez mieszania na 16-18 godzin.

Mieszaninę reakcyjną przeniesiono do 100 L reaktora, dodano metanol (9,48 kg) i ogrzano do 50-55°C, następnie dodano eter metylowo-*tert*-butylowy (MTBE, 24,5 kg) oraz wodę (27,7 kg). Mieszaninę przeniesiono do 100 L separatora wyposażonego w mieszadło, odczekano do ostygnięcia po czym rozdzielono fazy pozostawiając górną w separatorze. Fazę wodną ekstrahowano MTBE (11,15 kg) w oddzielnej kolbie, po czym do połączonych faz organicznych dodano porcjami wodę (4,5 kg, 3,0 kg i 5,10 kg) stale mieszając przez 16-18 godzin. Wytrącony osad odsączono, przemyto dwoma porcjami mieszaniny metanol/woda (2,85 kg MeOH i 8,40 kg wody) po czym suszono na powietrzu w 30-35°C do stałej masy otrzymując 0.45 kg surowego osadu protoescygeniny (HPLC ok. 75%).

Surowy osad poddano krystalizacji. W 20 L kolbie wyparkowej rozpuszczono protoescygeninę (300,0 g) w izopropanolu (4,80 kg) w 55°C, gorący roztwór przesączono oddzielając zanieczyszczenia mechaniczne. Przesącz zawrócono do kolby i ogrzano do 85°C, następnie dodano wody (3,30 kg) w 6 porcjach co 10 minut. Pozostawiono do ostygnięcia stale mieszając po czym pozostawiono w temperaturze otoczenia na 16-20 godzin. Wytrącony osad odsączono i suszono do stałej masy na powietrzu. Osad zawrócono do kolby wyparkowej i rozpuszczono w izopropanolu w 85°C po czym dodano cykloheksan (3,99 kg). Po ochłodzeniu i mieszaniu w temperaturze otoczenia przez



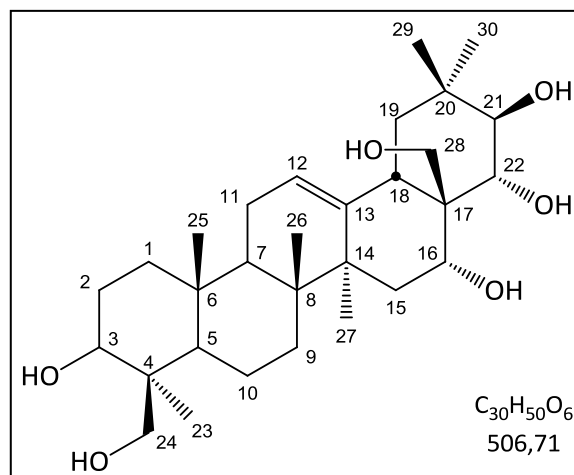
16-20 godzin osad odsączono i przemyto cykloheksanem (0,80 kg) otrzymując (w zależności od szarży) 197-209 g monohydratu protoescygeniny (HPLC >98%).

**M.p. (DSC)** = 322°C

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +31,52° (c 1,0, EtOH)

**MS** C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>6</sub> (ESI): 507 [M+H]<sup>+</sup>, 524 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 529 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  [ppm]: 5,19 (1H, m, H12), 4,96 (1H, d, J = 4,8 Hz, C3-OH), 4,43 (1H, dd, J = 4,4 oraz 5,8 Hz, C28-OH), 4,22 (1H, d, J = 4,4 Hz, C16-OH), 4,06 (1H, dd, J = 3,0 oraz 7,5 Hz, C24-OH), 4,03 (1H, m, H16), 3,97 (1H, d, J = 4,2 Hz, C21-OH), 3,82 (1H, m, H24), 3,81 (1H, d, J = 5,0 Hz, C22-OH), 3,79 (1H, dd, J = 4,2 oraz 9,6 Hz, H21), 3,60 (1H, dd, J = 5,0 oraz 9,6 Hz, H22), 3,27



(1H, dd, J = 7,6 oraz 11, 0 Hz, H24), 3,18 (1H, m, H3), 3,15 (1H, dd, J = 6,0 oraz 10,2 Hz, H28), 2,99 (1H, dd, J = 4,3 oraz 10,2 Hz, H28), 2,35 (1H, m, H19), 2,27 (1H, dd, J = 4,0 oraz 14,2 Hz, H18), 1,80 (2H, m, H11), 1,62 - 1,59 (2H, m, H2 oraz H15), 1,56 - 1,50 (4H, m, H1, H2, H6 oraz H9), 1,41 (1H, m, H7), 1,37 (1H, m, H6), 1,34 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,25 (1H, m, H7), 1,19 (1H, dd, J = 2,3 oraz 14,8 Hz, H15), 1,08 (3H, s, -CH<sub>3</sub> C23), 0,94 - 0,90 (2H, m, H1 oraz H19), 0,87 (3H, s, -CH<sub>3</sub> C25), 0,84 (3H, s, -CH<sub>3</sub> C29), 0,81 (3H, s, -CH<sub>3</sub> C26), 0,80 (3H, s, -CH<sub>3</sub> C30), 0,75 (1H, dd, J = 1,8 oraz 12,0 Hz, H5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  [ppm]: 143,1 (C13), 121,8 (C12), 78,6 (C3), 76,8 (C21), 74,0 (C22), 66,6 (C16), 65,2 (C28), 63,0 (C24), 55,4 (C5), 47,2 (C19), 46,2 (C7), 46,0 (C17), 42,1 (C4), 40,9 (C14), 39,5 (C18), 39,2 (C8), 38,2 (C1), 36,3 (C6), 35,3 (C20), 33,2 (C15), 32,8 (C9), 30,0 (-CH<sub>3</sub> 29), 27,2 (C2), 26,7 (-CH<sub>3</sub> 27), 23,2 (C11), 22,9 (-CH<sub>3</sub> 23), 18,8 (-CH<sub>3</sub> 30), 18,6 (C10), 16,3 (-CH<sub>3</sub> 26), 15,7 (-CH<sub>3</sub> 25).

## 4.2 28-O-propargilprotoescygenina (6)

[Próba otrzymania eteru propargilowego protoescygeniny bezpośrednio z protoescygeniny]

A.

Protoescygeninę (**1**, 112 mg, 0,22 mmola, 92%) rozpuszczono w THF (5 mL, suszony nad sodem), po czym dodano *tert*-butanolan potasu (95%, 183 mg, 1,55 mmola) i ogrzewano do rozpuszczenia całości substratu. Następnie ogrzewano we wrzeniu przez 10 minut po czym dodano bromku propargilu (80%, 99 mg, 0,66 mmola). Ogrzewano we wrzeniu przez 2 godziny. Kontrola TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-MeOH-woda 9:0,9:0,1; R<sub>f</sub> mieszaniny produktów ok. 0,85 lub CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH 45:45:10; R<sub>f</sub> mieszaniny produktów ok. 0,70) wykazała obecność nieprzereagowanego substratu. Dodano *tert* butanolan potasu (90 mg), bromek propargilu (45 mg), katalityczną ilość eteru koronowego 18-korona-6 i THF (2 mL). Ogrzewano we wrzeniu przez kilka godzin, stopień przereagowanie nie uległ zmianie.

Przeprowadzono 3 próbne ekstrakcje: woda/CHCl<sub>3</sub>, woda/octan etylu, woda/MTBE; nie zaobserwowano różnicy. Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (30 mL) i ekstrahowano MTBE (2 × 20 mL), połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2 × 20 mL). Fazę organiczną odparowano do sucha otrzymując 100 mg osadu.

Produkt oczyszczano chromatograficznie (5 g żelu krzemionkowego, eluent: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 7:3 → 1:1), otrzymano frakcje o czystości 72% lub niższej, co uniemożliwia potwierdzenie struktury.

### B. Warunki PTC

Protoescygeninę (**1**, 100 mg, 0,20 mmola, 97%) oraz TBABr (322 mg, 1,0 mmola) rozpuszczono w THF-ie (5 mL, suszony nad sodu), po czym dodano 50% roztwór KOH<sub>aq</sub> (5 mL). Ochłodzono mieszaninę do ok. 0°C (równoległe prowadzona reakcja w temperaturze pokojowej daje taki sam wynik) po czym kroplami dodano bromek propargilu (80%, 45 mg, 34 µL, 0,30 mmola)/1 mL THF. Kontrola TLC wskazała na nieprzereagowanie większości substratu. Dodano bromek propargilu (45 mg,

34  $\mu\text{L}/1\text{ mL}$  THF). Substrat uległ wyczerpaniu. Na TLC 5-6 produktów o zbliżonych współczynnikach  $R_f$ , rozdział chromatograficzny niemożliwy.

[Otrzymywanie eteru propargilowego protoescygeniny (**6**) z 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescygeniny (**3a**)]

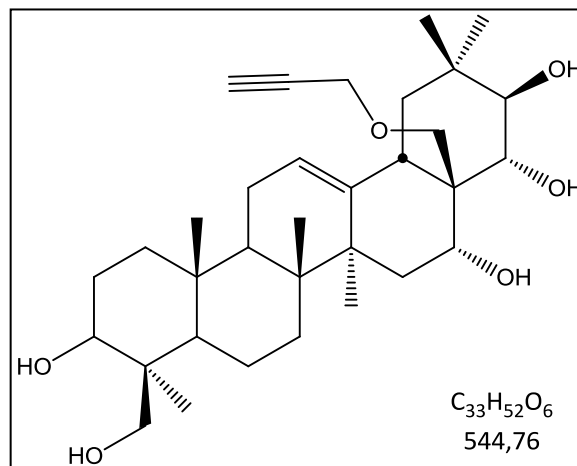
3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescygeninę (**3a**, 567 mg, 0,9 mmola) rozpuszczono w metanolu (25 mL) oraz  $\text{CHCl}_3$  (5 mL, dla polepszenia rozpuszczalności) w  $50^\circ\text{C}$ . Po uzyskaniu klarownej mieszaniny odstawiono ogrzewanie, dodano pTSA (25 mg/5 mL metanolu) i mieszano w *RT*. Po ok. 3 godzinach kontrola TLC (układ:  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt-MeOH}$  45:45:10,  $R_f$  produktu 0,50) wskazuje na niemal całkowite wyczerpanie substratu (dodanie pTSA i dłuższy czas nie zmienił wyniku).

Do mieszaniny dodano 3 krople trietyloaminy i mieszano przez 30 minut, po czym odparowano mieszaninę reakcyjną otrzymując 575 mg surowego produktu (szkliwo na ściankach kolby).

Produkt oczyszczano chromatograficznie (10 g żelu krzemionkowego; układ  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt}$  1:3;  $R_f = 0,27$ ) otrzymując 464 mg frakcję **6** z wydajnością 94,7% o czystości 98,37%. Suszono w suszarce próżniowej w  $40^\circ\text{C}$  przez noc.

Strukturę potwierdzono spektroskopią HRMS. Dokładne przypisanie struktury analizą NMR wykonano dla pochodnych z kolejnego etapu (pochodne od 4.5.6 do 4.5.11).

**HRMS**  $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_6$  (ESI): 567,3668  $[\text{M}+\text{Na}]^+$



#### 4.3 3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoescygenina (**2a**)

W reaktorze o pojemności 1 L wyposażonym w mieszadło mechaniczne zawieszono monohydrat protoescygeniny (60,0 g) w mieszaninie acetonu (300 mL) z 2,2-dimetoksypropanem (2,2-DMP, 300 mL). Następnie dodano monohydrat kwasu p-toluenosulfonowego (pTSA, 0,39 g) i kontynuowano mieszanie temperaturze otoczenia

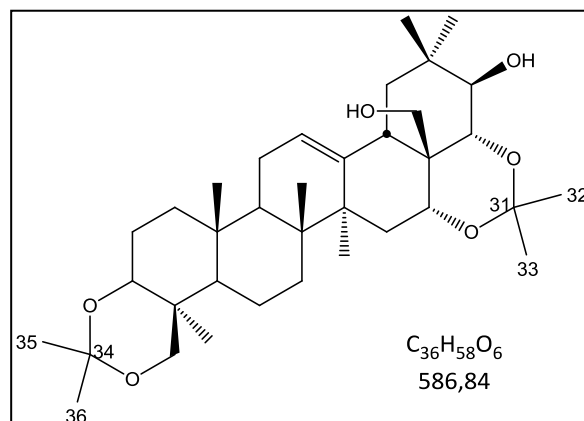
(18-23°C) przez 18-20 godzin (kontrola TLC, układ heksan-octan etylu 1:1). Dodano trietyloaminę (0,24 mL), po 30 minutach osad odsączono, przemyto acetonem i suszono. Surowy produkt przeniesiono do reaktora o poj. 2 L wyposażonego w mieszadło mechaniczne i chłodnicę zwrotną. Osad zawieszono w MTBE (1,2 L) i dodano trietyloaminę (0,96 mL) po czym mieszano w temperaturze wrzenia przez 1,5 godziny, następnie ochłodzono do temperatury otoczenia i mieszano przez kolejną godzinę. Osad odsączono i przemyto po czym suszono na powietrzu otrzymując biały osad 3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoprotoscygeniny (**2a**, 55,0 g; HPLC >98%).

**M.p. (DSC)** = 288°C

$[\alpha]_D^{20} = +31,8^\circ$  (c 1,0, THF)

**HRMS** C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub> (ESI): 609,4131 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 5,37 (1H, m, H12), 4,75 (1H, t, J = 4,8 Hz, C28-OH), 4,22 (1H, dd, J = 4,8 Hz, C21-OH), 3,92 (1H, d, J = 11,4 Hz, H24), 3,81 (1H, d, J = 9,0 Hz, H22), 3,66 (1H, dd, J = 4,8 oraz 9,0 Hz, H21), 3,41 (1H, m, H16), 3,37 (1H, dd, J = 4,8 oraz 9,0 Hz, H3), 3,31 - 3,14 (3H, m, H24 oraz 2H28), 2,0 - 1,8 (5H, m, H2, H11, H15 oraz



H19), 1,63 (1H, m, H2), 1,53 - 1,47 (4H, m, H1, H7, H10, H15), 1,45 (1H, m, H9), 1,39 (1H, m, H9), 1,34 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,33 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,30 (1H, d, J = 5,4 Hz, H10), 1,25 (6H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,20 (1H, dd, J = 3,6 oraz 12,6 Hz, H19), 1,15 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,12 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 1,08 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 1,03 (1H, m, H1), 0,93 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,88 (1H, d, J = 12,0 Hz, H5), 0,78 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26), 0,77 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 141,0 (C13), 121,7 (C12), 98,0 (C31), 97,8 (C34), 75,9 (C3), 75,7 (C21), 72,2 (C22), 68,3 (C16), 62,8 (C24), 62,3 (C28), 52,9 (C5), 46,8 (C7), 44,7 (C19), 43,1 (C17), 41,2 (C14), 40,3 (C18), 39,6 (C8), 36,9 (C4), 36,0 (C1), 35,8 (C6), 35,3 (C20), 35,0 (C15), 32,2 (C9), 30,4 (-CH<sub>3</sub> C29), 30,4 (-CH<sub>3</sub>), 27,9 (-CH<sub>3</sub> C27), 27,7 (-CH<sub>3</sub>), 25,7 (-CH<sub>3</sub> C23), 25,4 (-CH<sub>3</sub>), 24,4 (C2), 23,6 (-CH<sub>3</sub>), 22,7 (C11), 18,3 (-CH<sub>3</sub> C30), 18,2 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,5 (C6), 16,7 (-CH<sub>3</sub> C25).

#### 4.4 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoscygenina (**3a**) oraz 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-21-propargiloprotoscygenina (**3b**)

[Warunki z użyciem tert-butanolanu potasu]

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoprotoscygeninę (**2a**, 500 mg, 0,85 mmola, 97,5%) oraz tert-butanolan potasu (95%, 530 mg, 4,25 mmola) rozpuszczono w THF (70 mL, destylowany znad sodu) i ogrzewano we wrzeniu przez ok. 2 godziny (chłodnica zaopatrzona w rurkę z chlorkiem wapnia). Następnie dodano bromek propargilu (80% w toluenie, 260 mg, 1,77 mmola) i ogrzewano we wrzeniu przez kolejne 2 godziny (postęp reakcji kontrolowano TLC, układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 4:1) do całkowitego wyczerpania substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (70 mL) (tert-butanolan potasu rozpuszcza się, mieszanina mętnieje). Ekstrahowano chloroformem (2×50 mL), fazę organiczną przemyto 5% wodorowęglanem sodu (50 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu, odsączono środek suszący i odparowano otrzymując 579 mg osadu mieszaniny produktów (pianka).

Produkty reakcji: 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-21-propargiloprotoscygeninę **3b** (układ CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 4:1, R<sub>f</sub> = 0,34) oraz 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoscygeninę **3a** (R<sub>f</sub> = 0,42) rozdzielano chromatograficznie (20 g żelu krzemionkowego, eluent: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 6:1 → 5:1 → 4:1).

[Uwaga: lepszy rozdział osiąga się w przypadku użycia początkowo większej ilości eluentu 6:1.]

Otrzymano frakcję 376 mg 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoscygeniny (71%, HPLC 99,30%) oraz 145 mg 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-21-propargiloprotoscygeniny (27%, HPLC 92,08%). Osady suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

[Warunki PTC]

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoprotoscygeninę (**2a**, 6 g, 10,0 mmola, 98,63%) oraz bromek tetra-butyloamoniowy (8,22 g, 25,0 mmola) rozpuszczono w THF (135 mL). Następnie dodano 33% roztwór KOH (75g KOH/150 mL wody) i mieszano w RT (mieszanina

reakcyjna mętnieje). Wkroplono bromek propargilu (80% w toluenie, 2,280 g, 1,680 mL, 19,0 mmola) rozcieńczony w THF (15 mL), po czym mieszano dalej w RT (mieszanina staje się klarowna i nabiera brązowej barwy). Postęp reakcji kontrolowano TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 4:1) – po 2 godzinach substrat jest całkowicie wyczerpany.

Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza, następnie dodano wodę (100 mL). Ekstrahowano chloroformem (2 × 100 mL). Połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (100 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu, odsączono środek suszący i odparowano otrzymując ok. 15 g mieszaniny produktów (pianka).

Produkty reakcji rozdzielano chromatograficznie (160 g żelu krzemionkowego, eluent: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 6:1 → 5:1). Otrzymano frakcję 3,19 g 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeniny z wydajnością 51% o czystości 98,70%. Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

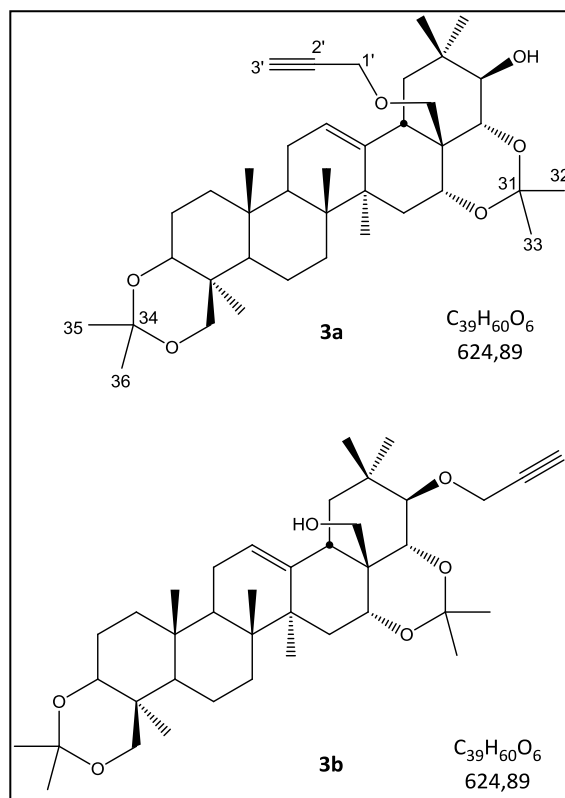
3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygenina (**3a**):

**M.p. (DSC)** = 213°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +42,1° (c 1,0, THF)

**HRMS** C<sub>39</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub> (ESI): 647,4288 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 5,32 (1H, t, J = 3,6 Hz, H<sub>12</sub>), 4,29 (1H, d, J = 5,2 Hz, C<sub>21</sub>-OH), 4,14 (1H, dd, J = 2,4, 16,1 Hz, H<sub>1'</sub>'), 4,08 (1H, dd, J = 2,4, 16,1 Hz, H<sub>1'</sub>'), 3,92 (1H, d, J = 11,6 Hz, H<sub>24</sub>), 3,76 (1H, d, J = 9,0 Hz, H<sub>22</sub>), 3,65 (1H, dd, J = 5,2 Hz, 9,0, H<sub>21</sub>), 3,48 (1H, m, H<sub>16</sub>), 3,41 (1H, t, J = 2,4 Hz, H<sub>3'</sub>'), 3,36 (1H, m, ov, H<sub>3</sub>), 3,35 (1H, m, ov, H<sub>28</sub>), 3,31 (1H, m, ov, H<sub>28</sub>), 3,13 (1H, d, J = 11,6 Hz, H<sub>24</sub>), 2,42 (1H, m, ov, H<sub>18</sub>), 1,98 (1H, m, ov, H<sub>15</sub>), 1,93 (1H, m, ov, H<sub>19</sub>), 1,90 (1H, m, ov, H<sub>2</sub>), 1,87 (1H, m, ov, H<sub>11</sub>), 1,62 (1H, m, H<sub>2</sub>), 1,51 (1H, m, ov, H<sub>1</sub>), 1,50 (1H, m, ov, H<sub>7</sub>),



1,49 (1H, m, ov, H15), 1,49 (1H, m, ov, H10), 1,46 (1H, m, ov, H9), 1,39 (1H, m, ov, H9), 1,33 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H33), 1,33 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H36), 1,31 (1H, m, ov, H10), 1,26 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H32), 1,24 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H35), 1,20 (1H, dd, J = 3,8 Hz, 13,1, H19), 1,14 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,11 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 1,08 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 1,02 (1H, m, ov, H1), 0,92 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,88 (1H, m, H5), 0,81 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26), 0,75 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 140,3 (C13), 122,4 (C12), 98,05 (-CH<sub>3</sub> C34), 98,02 (-CH<sub>3</sub> C31), 80,4 (C2'), 77,0 (C3'), 75,9 (C3), 75,6 (C21), 72,4 (C22), 70,8 (C28), 68,1 (C16), 62,8 (C24), 57,7 (C1'), 52,9 (C5), 46,8 (C7), 44,5 (C19), 42,3 (C17), 41,1 (C14), 40,8 (C18), 39,6 (C8), 36,9 (C4), 36,1 (C1), 35,8 (C6), 35,3 (C20), 34,6 (C15), 32,1 (C9), 30,4 (-CH<sub>3</sub> C29), 30,3 (-CH<sub>3</sub> C33), 27,8 (-CH<sub>3</sub> C27), 27,7 (-CH<sub>3</sub> C35), 25,7 (-CH<sub>3</sub> C23), 25,4 (-CH<sub>3</sub> C36), 24,3 (C2), 23,5 (-CH<sub>3</sub> C32), 22,6 (C11), 18,4 (-CH<sub>3</sub> C30), 18,2 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,5 (C10), 16,7 (-CH<sub>3</sub> C25).

3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-21-propargiloprotoescygenina (**3b**):

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +85,3° (c 1,0, THF)

**HRMS** C<sub>39</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub> (ESI): 647,4288 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 5,27 (1H, t, J = 3,6 Hz, H12), 4,81 (1H, d, J = 4,8, C28-OH), 4,32 (1H, d, J = 5,3 Hz, H22), 4,28 (1H, d, J = 2,4 oraz 16,1 Hz, H1'), 4,17 (1H, dd, J = 2,4 oraz 16,1 Hz, H1'), 4,15 (1H, m, H16), 3,91 (1H, d, J = 11,8 Hz, H24), 3,40 (1H, t, J = 2,4 Hz, H3'), 3,38 (1H, d, J = 5,3 Hz, H21), 3,37 (1H, dd, J = 4,6 oraz 9,3 Hz, H3), 3,29 (1H, dd, J = 4,8 oraz 11,2 Hz, H28), 3,14 (1H, d, J = 11,8 Hz, H24), 3,12 (1H, m, ov, H28), 2,34 (1H, t, J = 13,4 Hz, H19), 1,98 (1H, m, ov, H15), 1,96 (1H, m, ov, H18), 1,90 (1H, m, ov, H2), 1,83 (1H, dd, J = 3,8 oraz 9,0 Hz, H11), 1,63 (1H, m, H2), 1,52 (1H, m, ov, H1), 1,50 (1H, m, ov, H7), 1,48 (1H, m, ov, H10), 1,45 (1H, m, ov, H9), 1,40 (1H, m, ov, H9), 1,37 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H33), 1,34 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H36), 1,32 (1H, m, ov, H15), 1,30 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H32), 1,28 (1H, m, ov, H10), 1,25 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H35), 1,18 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,12 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 1,11 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 1,03 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 1,02 (1H, m, ov, H1), 0,97 (1H, m, ov, H19), 0,88 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,87 (1H, m, ov, H5), 0,84 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 142,5 (C13), 121,9 (C12), 98,1 (C34), 96,7 (C31), 83,6 (C21), 80,8 (C2'), 76,8 (C3'), 75,8 (C3), 67,8 (C22), 66 (C16), 63,4 (C28), 62,9 (C24), 58 (C1'), 52,8 (C5), 46,3 (C7), 46,2 (C19), 41 (C14), 39,95 (C18), 39,27 (C8), 38,2 (C17), 36,9 (C4), 36,1 (C1), 35,73 (C6), 35,19 (C20), 32,7 (C9), 31,9 (-CH<sub>3</sub> C29), 30,9 (C15), 30,1

(-CH<sub>3</sub> C32), 27,5 (-CH<sub>3</sub> C35), 25,8 (-CH<sub>3</sub> C23), 25,47 (-CH<sub>3</sub> C27), 25,42 (-CH<sub>3</sub> C36), 24,3 (C2), 23,5 (-CH<sub>3</sub> C30), 22,9 (C11), 20,8 (-CH<sub>3</sub> C33), 17,56 (C10), 17,48 (-CH<sub>3</sub> C26), 16,8 (-CH<sub>3</sub> C25).

#### 4.5 Pochodne zawierające pierścień 1,2,3-triazolu

##### 4.5.1 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeniny z kwasem 4-azydobenzoowym (**4a**)

3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeninę (**3a**, 110 mg, 0,17 mmola) i kwas 4-azydobenzoowy (64 mg, 0,21 mmola) rozpuszczono w *t*BuOH (7,5 mL) i dodano wody (4 mL). Następnie dodano roztwór Cu(AcO)<sub>2</sub> (1,5 mL roztworu 280 mg/10 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (AscNa, 1,5 mL roztworu 260 mg/10 mL wody). Mieszanina zmieniła barwę na brązową na kilka sekund, po czym mętnieje. Po 3 dobach mieszanina zmieniła barwę na jasnozieloną, kontrola TLC (układ CHCl<sub>3</sub>-MeOH 9:1 - R<sub>f</sub> produktu = 0,34; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 85:15 - R<sub>f</sub> = 0,40) wskazuje na całkowite wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (200 mL) i ekstrahowano chlorkiem metylenu (20 mL + 2×15 mL). Połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (25 mL), następnie wysuszono nad bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 178 mg osadu surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy (12 g); eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 85:15. Otrzymano frakcję 74 mg 28-O-[(1-(4-carboksyfenylo)-1H[1,2,3]triazol-4-ylo)metylo]-3,24;16,22-O,O-diisopropylideneprotoescygeniny (**4a**) o czystości 91,1%. Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**M.p. (DSC)** = 184,4°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +8,55° (c 1,0, THF)

**HRMS** C<sub>46</sub>H<sub>65</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> (ESI): 810,4669 [M+Na]<sup>+</sup>

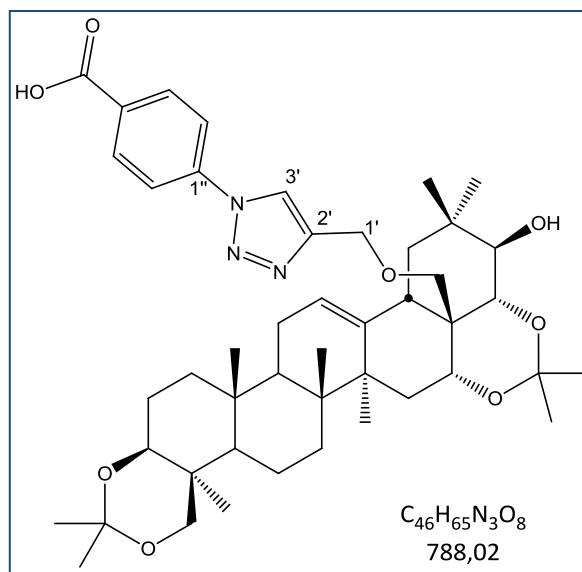
**<sup>1</sup>H NMR** (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 13,20 (1H, bs, -COOH), 9,04 (1H, s), 8,14 (2H, BB', J = 8,8 Hz, -Ph-COOH), 8,10 (2H, AA', J = 8,7 Hz, -Ph-COOH), 4,85 (1H, bs), 4,77 (1H, d, J = 12,8 Hz), 4,47 (1H, d, J = 12,9 Hz), 4,23 (1H, d, J = 4,4 Hz), 3,82 (1H, d, J = 9,6 Hz), 3,79 (1H, d, J = 12,3 Hz), 3,68 (1H, dd, J = 4,6 oraz 9,2 Hz), 3,36 - 3,26 (4H, m, ov), 3,14 (1H, d,



J = 8,3 Hz), 3,07 (1H, d, J = 11,4 Hz), 2,40 (1H, dd, J = 3,1 oraz 14,2 Hz, H18), 1,89 - 1,75 (5H, m, ov), 1,56 - 1,38 (7H, m, ov), 1,35 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,30 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,28 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,23 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,18 (1H, d, J = 11,0 Hz), 1,06 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,04 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 0,92 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 0,88 - 0,85 (1H, m), 0,77 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 0,75 (1H, m, ov), 0,61 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 0,53 (3H, s, -CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]:

166,3 (-COOH), 144,8 (C1''), 139,9, 139,5, 131,1 (-Ph-COOH), 130,5 (-Ph-COOH), 122,7 (C3'), 121,8 (C12), 119,3 (-Ph-COOH), 98,3, 97,7, 75,9, 75,6, 72,7, 69,7 (C28), 68,4 (C16), 62,7, 62,6, 52,8 (C5), 46,6, 44,2, 43,0, 41,0, 40,8, 39,6, 36,7, 35,7, 35,5, 35,4, 35,1, 31,9 (C9), 30,33, 30,16, 28,1, 27,8, 25,6, 25,2, 24,2, 24,0, 22,4, 18,0, 17,8, 17,4, 16,2.



#### 4.5.2 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescygeniny z 1-azydo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozą (**4b**)

3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilprotoescygeninę (**3a**, 500 mg, 0,80 mmola) i 1-azydo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-gluko-piranozę (329 mg, 0,88 mmola) rozpuszczono w tBuOH (40 mL) i dodano wodę (20 mL). Następnie dodano roztwór Cu(AcO)<sub>2</sub> (3,7 mL, 0,31 mmola, roztwór 160 mg/10 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (5,8 mL, 0,48 mmola, roztwór 220 mg/10 mL wody). Mieszanina nabiera brązowej barwy na kilka sekund, po czym mętnieje. Po 3 dobach mieszanina barwy jasnozielonej, kontrola TLC (układ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 7:3 – R<sub>f</sub> produktu = 0,38; układ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 4:1, R<sub>f</sub> = 0,13) wskazuje na niecałkowite wyczerpanie substrat. Dodano azydocukier (100 mg/1,5 mL tBuOH), roztwór Cu(AcO)<sub>2</sub> (1 mL), roztwór AscNa (2 mL). Po 24 godzinach TLC – stopień przereagowania nie uległ zmianie.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (70 mL) i ekstrahowano chlorkiem metylenu (50 mL + 2 × 25 mL + solanka). Połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem

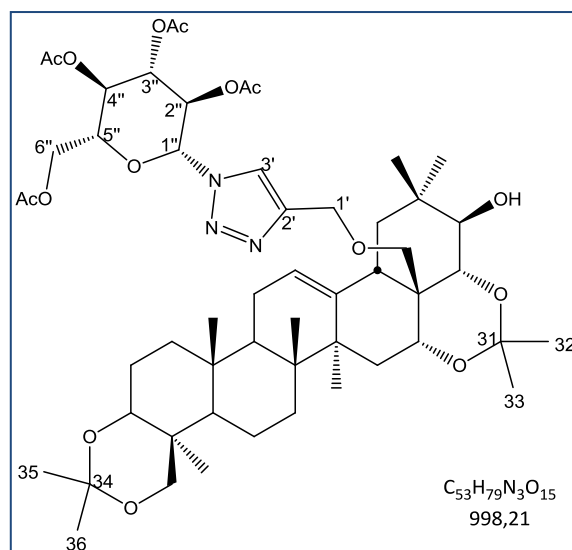
sodu (50 mL), następnie wysuszono nad bezwodny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 881 mg osadu surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 45 g; eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 9:1 → 6:4). Otrzymano frakcję 562 mg produktu (**4b**) o czystości 97,42% (wydajność 70,4%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -4,23° (c 1,0, THF)

HRMS C<sub>53</sub>H<sub>79</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub> (ESI): 1020,5409 [M+Na]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 8,38 (1H, s, H3'), 6,35 (1H, m, H1''), 5,60 (1H, m, ov, H3''), 5,59 (1H, m, ov, H2''), 5,17 (1H, m, H4''), 5,05 (H12), 4,54 (1H, d, J = 12,5 Hz, H1'), 4,44 (1H, d, J = 12,5 Hz, H1'), 4,39 (1H, ddd, J = 2,4, 5,8 oraz 10,1 Hz, H5''), 4,23 (1H, m, C21-OH), 4,15 (1H, dd, J = 5,8 oraz 12,5 Hz, H6''), 4,05 (1H, dd, J = 2,4 oraz 12,5 Hz, H6''), 3,94 (H24), 3,78 (H22), 3,65 (H21), 3,45 (H16), 3,37 (H3), 3,33



(H28), 3,27 (H28), 3,15 (H24), 2,38 (H18), 2,03 (3H, s, C4''-OCOCH<sub>3</sub>), 1,98 (3H, s, C6''-OCOCH<sub>3</sub>), 1,96 (3H, s, C3''-OCOCH<sub>3</sub>), 1,94 (H2), 1,92 (H15), 1,90 (H19), 1,83 (H11), 1,78 (3H, s, C2''-OCOCH<sub>3</sub>), 1,72 (H11), 1,63 (H2), 1,55 (H1), 1,50 (H10), 1,47 (H15), 1,45 (H7), 1,44 (H9), 1,36 (H9), 1,36 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H36), 1,33 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H33), 1,32 (H10), 1,26 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H32), 1,25 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H35), 1,16 (H19), 1,13 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 1,11 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,09 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 1,00 (H1), 0,91 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,87 (H5), 0,75 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26), 0,72 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 169,9 (C6''-COCH<sub>3</sub>), 169,5 (C3''-COCH<sub>3</sub>), 169,3 (C4''-COCH<sub>3</sub>), 168,4 (C2''-COCH<sub>3</sub>), 144,6 (C2'), 140,3 (C13), 122,8 (C3'), 122,2 (C12), 98,06 (-CH<sub>3</sub> C31), 98,00 (-CH<sub>3</sub> C34), 83,9 (C1''), 76,1 (C3), 75,6 (C21), 73,2 (C5''), 72,4 (C22), 72,0 (C3''), 70,9 (C28), 70,3 (C2''), 68,2 (C16), 67,7 (C4''), 63,3 (C1'), 62,8 (C24), 62,0 (C6''), 53,1 (C5), 46,8 (C7), 44,5 (C19), 42,6 (C17), 41,1 (C14), 40,9 (C18), 39,6 (C8), 36,9 (C4), 36,1 (C1), 35,8 (C6), 35,3 (C20), 34,8 (C15), 32,1 (C9), 30,34 (-CH<sub>3</sub> C29), 30,28 (-CH<sub>3</sub> C33), 27,90

(-CH<sub>3</sub> C27), 27,90 (-CH<sub>3</sub> C35), 25,7 (-CH<sub>3</sub> C23), 25,4 (-CH<sub>3</sub> C36), 24,5 (C2), 23,6 (-CH<sub>3</sub> C32), 22,7 (C11), 20,43 (C6''-COCH<sub>3</sub>), 20,37 (C4''-COCH<sub>3</sub>), 20,21 (C3''-COCH<sub>3</sub>), 19,9 (C2''-COCH<sub>3</sub>), 18,25 (-CH<sub>3</sub> C30), 18,14 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,5 (C10), 16,7 (-CH<sub>3</sub> C25).

#### 4.5.3 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-4-O-benzylo-2,3,6-trideoksy-β-L-lykso-heksapiranozą (**4c**)

3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeninę (**3a**, 500 mg, 0,80 mmola) i 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-4-O-benzylo-2,3,6-trideoksy-β-L-lyksoheksapiranozę (332 mg, 0,88 mmola) rozpuszczono w *t*BuOH (40 mL) i dodano wody (20 mL). Następnie dodano roztwór Cu(AcO)<sub>2</sub> (3,7 mL, 0,31 mmola, roztwór 160 mg/10 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (5,8 mL, 0,48 mmola, roztwór 220 mg/10 mL wody). Mieszanina nabiera brązowej barwy na kilka sekund, po czym mętnieje. Następnego dnia mieszanina barwy jasnooliwkowej, kontrola TLC (układ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 4:1; R<sub>f</sub> produktu = 0,70) wskazuje na niecałkowite przereagowanie substratu. Dodano azydocukru (100 mg/1,5 mL *t*BuOH), roztwór Cu(AcO)<sub>2</sub> (1 mL), roztwór AscNa (2 mL); mieszanina znów lekko mętnieje. Po 4 godzinach TLC - substrat wyczerpany. Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (70 mL) i ekstrahowano CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL + 2×25 mL, konieczny dodatek solanki). Fazę organiczną przemyto 5% wodorowęglanem sodu (50 mL), następnie wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 873 mg osadu surowego produktu.

Produkt oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 45 g; eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 95:5 → 90:10 → 80:20 → 70:30). Otrzymano frakcję 527 mg produktu (**4c**) o czystości 95,74% (wydajność 65,7%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

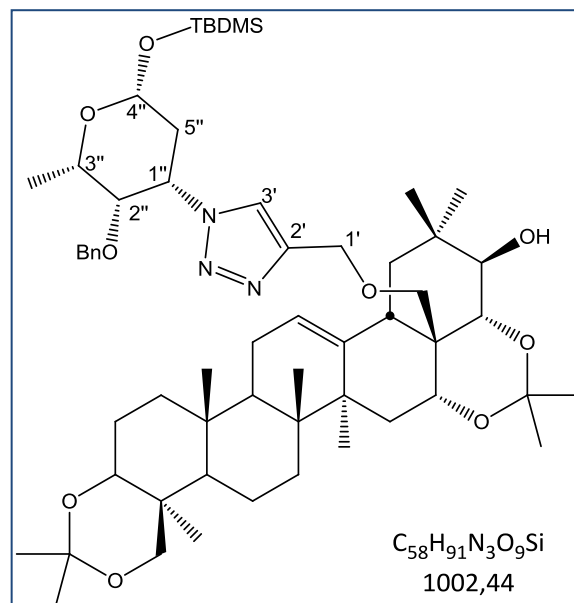
**M.p. (DSC)** = 240°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +9,30° (c 1,0, THF)

**HRMS** C<sub>58</sub>H<sub>91</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> (ESI): 1024,6422 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 8,20 (1H, s, H3'), 7,27 (m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 7,07 (m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5,01 (1H, m, H1''), 4,94 (1H, m, ov, H4''), 4,94 (H12), 4,61 (1H, d, J = 12,5 Hz, H1'), 4,38 (1H, d, J = 12,5 Hz, H1'), 4,24 (1H, C21-OH), 4,01 (d, J = 10,8 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 3,93

(H24), 3,83 (H22), 3,82 (1H, m, ov, H3''), 3,67 (1H, m, ov, H2''), 3,66 (H21), 3,54 (1H, d, J = 10,8 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 3,42 (H16), 3,36 (H3), 3,30 (H28), 3,19 (H28), 3,14 (H24), 2,38 (H18), 2,25, 1,98 (1H, m, ov, H5''), 1,93 (H2), 1,89 (H15), 1,87 (H19), 1,73 (H11), 1,62 (H2), 1,5 (H1), 1,5 (H11), 1,49 (H10), 1,45 (H15), 1,43 (H7), 1,41 (H9), 1,35 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H35), 1,35 (H9), 1,33 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H32), 1,25 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H33), 1,25 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H36), 1,25 (H10), 1,16 (C3''-CH<sub>3</sub>), 1,15 (H19),



1,12 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 1,09 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,03 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,98 (H1), 0,91 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,88 (9H, s, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,86 (H5), 0,73 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,64 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26), 0,10 (6H, s, -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 143,5 (C2'), 140,2 (C13), 137,5 (-Ph), 128,19 (-Ph), 128,08 (-Ph), 127,6 (-Ph), 123,5 (C3'), 121,9 (C12), 98,1 (-CH<sub>3</sub> C31), 97,9 (-CH<sub>3</sub> C34), 94,3 (C4''), 76,8 (C2''), 76,2 (C3), 75,6 (C21), 74,4 (-OCH<sub>2</sub>-Ph), 72,6 (C22), 70,5 (C3''), 70,2 (C28), 68,2 (C16), 63,1 (C1'), 62,7 (C24), 58,2 (C1''), 53,1 (C5), 46,7 (C7), 44,4 (C19), 42,6 (C17), 41,1 (C14), 40,8 (C18), 39,5 (C8), 36,8 (C4), 36,1 (C1), 35,8 (C6), 35,3 (C20), 34,9 (C15), 33,2 (C5''), 32,1 (C9), 30,3 (-CH<sub>3</sub> C29), 30,3 (-CH<sub>3</sub> C32), 28,1 (-CH<sub>3</sub> C36), 27,9 (-CH<sub>3</sub> C27), 25,67 (-CH<sub>3</sub> C23), 25,61 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25,41 (-CH<sub>3</sub> C35), 24,6 (C2), 23,7 (-CH<sub>3</sub> C33), 22,5 (C11), 18,20 (-CH<sub>3</sub> C30), 18,09 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,6 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17,4 (C10), 16,8 (C3''-CH<sub>3</sub>), 16,5 (-CH<sub>3</sub> C25), -4,2 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5,1 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 4.5.4 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilo-protoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutyldimetylosililo-2,3-dideoksy-β-D-arabinoheksopiranozą (**4d**)

3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeninę (**3a**, 1,50 g, 2,4 mmola) i 3-azydo-1-O-tertbutyldimetylosililo-2,3-dideoksy-β-D-arabinoheksopiranozę (1,09 g, 3,6 mmola) rozpuszczono w tBuOH (120 mL) i dodano wody (60 mL). Następnie dodano

roztwór  $\text{Cu}(\text{AcO})_2$  (13,9 mL, 1,2 mmola, roztwór 240 mg/15 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (20,3 mL, 1,68 mmola, roztwór 660 mg/30 mL wody). Mieszanina na kilka sekund nabiera brązowej barwy po czym mętnieje. W mieszaninie pozostaje nierozpuszczony całkowicie substrat trójterpenowy. Po nocy kontrola TLC (układ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt 3:7) wskazuje na niecałkowite przereagowanie substratu. Nierozpuszczony nadal substrat odsączono, rozpuszczono w świeżej porcji  $t\text{BuOH}$  i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i połączone z mieszaniną reakcyjną po czym dodano roztwór  $\text{Cu}(\text{AcO})_2$  (9 mL) i roztwór askorbinianu sodu (13 mL). Po 4 godzinach substrat wyczerpany.

Dodano wodę (100 mL) i ekstrahowano chlorkiem metylenu (100 mL + 50 mL + solanka). Połączone fazy organiczne przemyto wodą (100 mL), wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Otrzymano 2,83 g osadu surowego produktu.

Produkt oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 90 g; eluent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt 1:1  $\rightarrow$  4:6  $\rightarrow$  3:7). Otrzymano frakcję 415 mg produktu (**4d**) o czystości 96.78% (wydajność 18,6%). Suszono w suszarce próżniowej w  $40^\circ\text{C}$  przez noc.

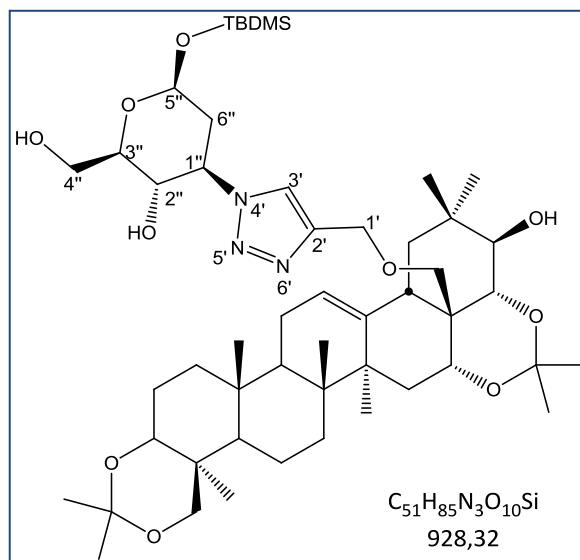
$[\alpha]_D^{20} = +20,02^\circ$  ( $c$  1,0, THF)

**HRMS**  $\text{C}_{51}\text{H}_{85}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{Si}$  (ESI): 950,5902  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**$^1\text{H}$  NMR** (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  [ppm]:

8,15 (s,  $\text{H}3'$ ), 5,18 (d,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{C}2''\text{-OH}$ ), 5,01 (m, ov,  $\text{H}5''$ ), 4,99 (H12), 4,62 (ddd,  $J = 4,6, 9,8, 14,5$  Hz,  $\text{H}1''$ ), 4,54 (m, ov,  $\text{H}1'$ ), 4,52 ( $\text{C}4''\text{-OH}$ ), 4,43 (d,  $J = 12,5$  Hz,  $\text{H}1'$ ), 4,26 ( $\text{C}21\text{-OH}$ ), 3,93 ( $\text{H}24$ ), 3,81 ( $\text{H}22$ ), 3,70 (ddd,  $J = 2,0, 4,8$  oraz  $11,5$  Hz,  $\text{H}4''$ ), 3,65 ( $\text{H}21$ ), 3,61 (m,  $\text{H}2''$ ), 3,54 (m, ov,  $\text{H}4''$ ), 3,45 ( $\text{H}16$ ), 3,35 ( $\text{H}3$ ), 3,33 (m, ov,  $\text{H}3''$ ), 3,31 ( $\text{H}28$ ), 3,27 ( $\text{H}28$ ), 3,14 ( $\text{H}24$ ), 2,38 ( $\text{H}18$ ),

2,15 (ddd,  $J = 1,8, 4,4$  oraz  $12,0$  Hz,  $\text{H}6''$ ), 2,07 (m,  $\text{H}6''$ ), 1,92 ( $\text{H}2$ ), 1,9 ( $\text{H}19$ ), 1,88 ( $\text{H}15$ ), 1,75 ( $\text{H}11$ ), 1,61 ( $\text{H}2$ ), 1,61 ( $\text{H}11$ ), 1,5 ( $\text{H}1$ ), 1,49 ( $\text{H}6$ ), 1,45 ( $\text{H}15$ ), 1,44 ( $\text{H}9$ ), 1,41 ( $\text{H}7$ ), 1,36 ( $\text{H}7$ ), 1,35 ( $\text{H}36$ ), 1,33 ( $\text{H}32$ ), 1,29 ( $\text{H}6$ ), 1,27 ( $\text{H}33$ ), 1,25 ( $\text{H}35$ ), 1,17 ( $\text{H}19$ ), 1,12 ( $\text{H}23$ ), 1,10



(H27), 1,05 (H25), 0,98 (H1), 0,92 (H29), 0,87 (s, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,85 (H5), 0,76 (H30), 0,68 (H26), 0,12 (s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 143,3 (C2'); 140,3 (C13), 123,3 (C3'), 122,0 (C12), 98,01 (C31), 97,95 (C34), 94,3 (C5''), 78,2 (C3''), 76,1 (C3), 75,6 (C21), 72,5 (C22), 70,5 (C28), 68,4 (C2''), 68,2 (C16), 63,3 (C1'), 62,8 (C24), 61,6 (C1''), 60,9 (C4''), 53,1 (C5), 46,8 (C9), 44,5 (C19), 42,5 (C17), 41,1 (C14), 40,8 (C18), 39,9 (C6''), 39,5 (C8), 36,8 (C4), 36,2 (C1), 35,8 (C10), 35,3 (C20), 34,7 (C15), 32,1 (C7), 30,4 (C29), 30,3 (C32), 27,94 (C35), 27,83 (C27), 25,69 (C23), 25,62 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25,4 (C36), 24,5 (C2), 23,6 (C33), 22,8 (C11), 18,4 (C30), 18,0 (C26), 17,85 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17,45 (C6), 16,7 (C25), -4,1 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5,2 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>15</sup>N NMR** (60 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: -126,0 (N4'), -19,7 (N5'), -24,4 (N6').

#### 4.5.5 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilo-protoescygeniny z 1,6-anhydro-2-azydo-2-deoksy-β-D-glukopiranozą (**4e**)

3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargilo-protoescygeninę (**3a**, 200 mg, 0,32 mmola) oraz 1,6-anhydro-2-azydo-2-deoksy-β-D-glukopiranozę (76 mg, 0,41 mmola) rozpuszczono w *t*BuOH (16 mL) lekko podgrzewając i dodano wodę (8 mL), mieszano w *RT* (klarowna bezbarwna mieszanina). Następnie dodano roztwór Cu(AcO)<sub>2</sub> (1,6 mL, 0,14 mmola, roztwór 160 mg/10 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (2,8 mL, 0,21 mmola, roztwór 220 mg/10 mL wody). Mieszanina nabiera brązowej barwy na kilka sekund, następnie barwa znika a mieszanina mętnieje. Po 24 godzinach mieszanina klarowna, barwy zielonej, kontrola TLC wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (50 mL), ekstrahowano chloroformem (2 × 50 mL i 25 mL) a połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2 × 25 mL) i wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego odparowano rozpuszczalnik otrzymując 231 mg surowego produktu.

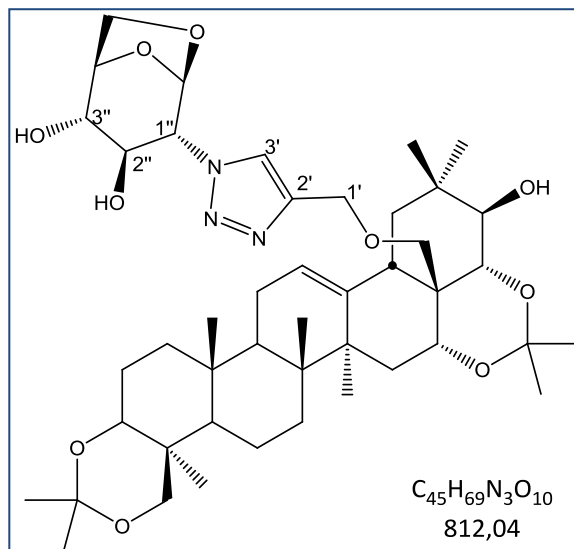
Oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 20 g; eluent: CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>-*i*PrOH 9:1 → 8:2 → 7:3. Otrzymano frakcję produktu (**4e**) o czystości 96,90%. Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**M.p. (DSC)** = 223-232°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +38,20° (c 0,50, DMSO)

**HRMS** C<sub>45</sub>H<sub>69</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> (ESI): 835,0332 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO), δ [ppm]: 8,36 (1H, s, H3'), 5,70 - 5,68 (2H, m, C2''-OH oraz C3''-OH), 5,34 (1H, s, H12), 5,03 (1H, bs, H1''), 4,59 (1H, d, J = 6,1 Hz), 4,56 (2H, m), 4,43 (1H, d, J = 12,5 Hz), 4,24 (1H, d, J = 4,7 Hz, C21-OH), 4,12 (1H, d, J = 6,4 Hz), 3,93 (1H, d, J = 11,6 Hz, H24), 3,8 (1H, d, J = 9,2 Hz, H22), 3,74 - 3,69 (1H, m), 3,69 - 3,62 (2H, m), 3,63 - 3,58 (1H, m), 3,44 (2H, qd, J = 5,1 oraz 7,0 Hz, H16), 3,39 - 3,33 (2H,



m), 3,32 (2H, s), 3,26 (1H, d, J = 8,5 Hz), 3,14 (1H, d, J = 11,5 Hz, H24), 2,41 (1H, d, J = 11,3 Hz, H18), 1,98 - 1,84 (3H, m), 1,84 - 1,74 (1H, m), 1,69 - 1,58 (2H, m), 1,57 - 1,40 (5H, m), 1,40 (1H, m, ov), 1,35 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,33 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,33 (1H, m, ov), 1,27 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,25 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,18 (1H, dd, J = 3,2 oraz 13,0), 1,12 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,11 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,09 - 1,04 (4H, m), 1,02 (1H, m), 0,86 (1H, d, J = 11,9 Hz), 0,75 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 0,71 (3H, s, -CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 MHz, DMSO), δ [ppm]: 143,9 (C2'), 140,3 (C13), 124,0 (C3'), 122,9 (C12), 99,8 (C1''), 98,03, 97,97, 76,3, 76,1, 75,6, 72,5, 71,3, 70,7, 70,5, 68,1 (C16), 64,9, 63,5, 62,9, 62,8, 53,1 (C5), 46,8, 44,4, 41,10, 41,06, 40,8, 36,8, 36,1, 35,8, 35,3, 34,8, 32,1 (C9), 30,32, 30,27, 27,9, 25,7, 25,4, 24,5, 23,6, 22,7, 18,5, 18,0, 17,4, 16,5.

#### 4.5.6 Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z kwasem 4-azydobenzoesowym (**7a**)

28-propargilprotoescygeninę (**6**, 200 mg, 0,37 mmola) i kwas 4-azydobenzoesowy (66 mg, 0,40 mmola) rozpuszczono w *t*BuOH (16 mL). Następnie dodano wodę (8 mL) i mieszano w temperaturze pokojowej po czym dodano roztwór Cu(AcO)<sub>2</sub> (1,6 mL, 0,14 mmola, roztwór 160 mg/10 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (2,8 mL, 0,21 mmola, roztwór 220 mg/10 mL wody). Mieszanina nabiera zielonej barwy i lekko

mętnieje. Po 24 godzinach mieszanina staje się klarowna, barwy zielonej, kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ - $i\text{PrOH}$  85:15;  $R_f$  produktu = 0,16) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (40 mL) i ekstrahowano octanem etylu ( $2 \times 40$  mL) i  $\text{CHCl}_3$  (40 mL, nie ma w niej produktu). Połączone fazy organiczne z octanu etylu wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 367 mg surowego produktu.

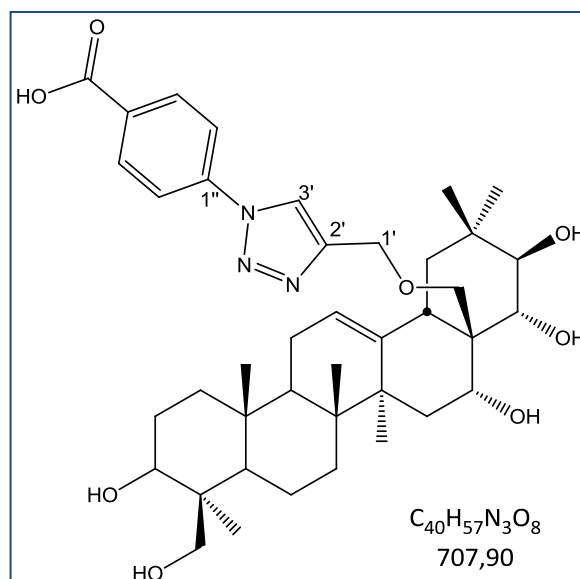
Produkt oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 15 g; eluent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $i\text{PrOH}$  90:10  $\rightarrow$  75:25). Otrzymano frakcje 105 mg produktu (**7a**) o czystości 93,19% (wydajność 40,1%). Suszono w suszarce próżniowej w  $40^\circ\text{C}$  przez noc.

**M.p. (DSC)** =  $281^\circ\text{C}$

$[\alpha]_D^{20} = -0,5^\circ$  (c 1,0, DMSO)

**HRMS**  $\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_8$  (ESI): 730,4043  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**$^1\text{H}$  NMR** (600 Hz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  [ppm]: 13,21 (1H, bs, -COOH), 8,87 (1H, s, -Ph-COOH), 8,13 (2H, BB', -Ph-COOH), 8,08 (2H, AA', -Ph-COOH), 5,12 (1H, m, H12), 4,92 (1H, m, C3-OH), 4,72 oraz 4,47 (2xd,  $J = 13,1$  Hz, H1'), 4,27 (1H, d,  $J = 4,4$  Hz, C16-OH), 3,91 (1H, m, H16), 3,80 - 3,70 (3H, m, ov, H21, H22 oraz H24), 3,18 (1H, m, H24), 3,12 - 3,08 (2H, m, ov, H3 oraz H28), 2,84 (d,  $J = 8,5$  Hz, H28), 2,46 (1H, dd,  $J = 4,0$  oraz



14,3 Hz, H18), 2,32 (1H, t,  $J = 13,2$  Hz, H19), 1,62 (1H, m, H11), 1,54 - 1,30 (7H, m, ov, H1, H2, H7, H9, H10, H11 oraz H15), 1,27 (3H, s, - $\text{CH}_3$  H27), 1,20 - 1,08 (3H, m, ov, H9, H10 oraz H15), 1,03 (3H, s, - $\text{CH}_3$  H23), 0,92 (1H, dd,  $J = 4,4$  oraz 12,6 Hz, H19), 0,84 oraz 0,83 (6H, s, - $\text{CH}_3$  H29 oraz - $\text{CH}_3$  H30), 0,81 (1H, m, ov, H1), 0,64 (1H, d,  $J = 12,0$  Hz), 0,46 (3H, s, - $\text{CH}_3$  H25), 0,36 (3H, s, - $\text{CH}_3$  H26).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (150 Hz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  [ppm]: 166,4 (-COOH), 145,5 (C1''), 142,6 (C13), 139,5 (-Ph), 131,1 (-Ph), 131,0, 130,5 (-Ph), 122,1 (C3'), 121,9 (C12), 119,3 (-Ph), 78,5 (C3), 76,9 (C21), 71,8 (C22), 70,7 (C28), 66,9 (C16), 63,3 (C1'), 62,9 (C24), 55,2 (C5), 46,9 (C19), 46,1



(C7), 46,0 (C17), 42,0 (C4), 40,6 (C14), 39,2 (C18), 38,9 (C8), 38,1 (C1), 36,0 (C6), 35,4 (C20), 33,4 (C15), 32,6 (C9), 29,9 (-CH<sub>3</sub> C30), 27,1 (C2), 26,6 (-CH<sub>3</sub> C27), 23,0 (C11), 22,8 (-CH<sub>3</sub> C23), 18,8 (-CH<sub>3</sub> C29), 18,4 (C10), 15,7 (-CH<sub>3</sub> C26), 15,1 (-CH<sub>3</sub> C25).

#### 4.5.7 Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z 1-azydo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-gluko-piranozą (**7b**)

28-propargilprotoescygeninę (**6**, 100 mg, 0,18 mmola) rozpuszczono w *t*BuOH (8 mL) delikatnie podgrzewając. Następnie dodano 1-azydo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-gluko-piranozę (75 mg, 0,20 mmola) i wodę (4 mL), mieszano w *RT* (klarowna bezbarwna mieszanina) po czym dodano roztwór Cu(AcO)<sub>2</sub> (0,8 mL, 0,072 mmola, roztwór 160 mg/10 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (1,4 mL, 0,108 mmola, roztwór 220 mg/10 mL wody). Mieszanina nabiera brązowej barwy na kilka sekund, następnie staje się bezbarwna. Po 48 godzinach mieszanina klarowna, barwy jasnooliwkowej, kontrola TLC (układ CHCl<sub>3</sub>-*i*PrOH 85:15; R<sub>f</sub> produktu = 0,24) wskazuje na niecałkowite zużycie substratu trójterpenowego. Dodano azydocukier (40 mg /2 mL THF), roztwór Cu(AcO)<sub>2</sub> (0,8 mL) i AscNa (1,4 mL), substrat nie został wyczerpany.

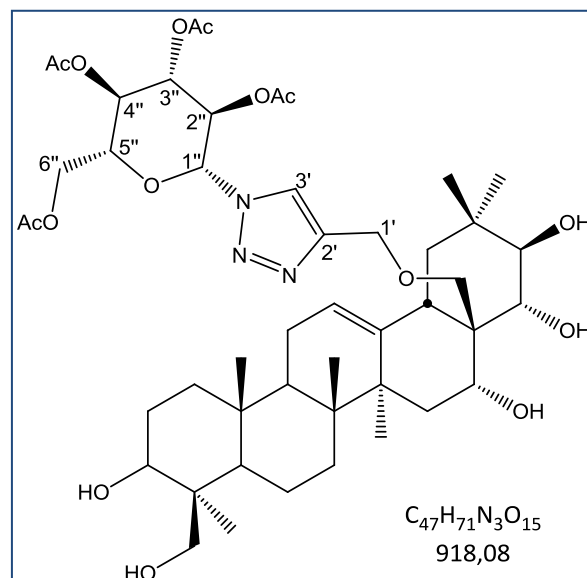
Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (40 mL) i ekstrahowano octanem etylu (3 × 25 mL + solanka) a połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2 × 25 mL). Ponieważ w fazie wodnej pozostał produkt ekstrahowano chlorkiem metylenu (2 × 30 mL). Fazy organiczne połączono i wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 260 mg surowego produktu.

Produkt oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 15 g; eluent: CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>-*i*PrOH 90:10 → 85:15 → 80:20). Otrzymano frakcję 20 mg produktu (**7b**) o czystości 91,65% (wydajność 12,1%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**HRMS** C<sub>47</sub>H<sub>71</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub> (ESI): 940,4800 [M+Na]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H NMR** (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 8,29 (1H, s, H3'), 6,33 (1H, d, J = 9,0 Hz, H1''), 5,61 (1H, t, J = 9,6 Hz, H3''), 5,56 (1H, t, J = 9,6 Hz, H2''), 5,20 - 5,16 (2H, m, ov, H12 oraz H4''), 4,49 (1H, d, J = 12,6 Hz, H1'), 4,43 (1H, d, J = 12,4 Hz, H1'), 4,37 (1H, m, H5''), 4,28 (1H, d, J = 4,8 Hz, C16-OH), 4,14 (1H, dd, J = 5,2 oraz 12,8 Hz, H6''), 3,93 (2H, m, ov, H16 oraz

C21-OH), 3,83 (1H, dd,  $J = 1,6$  oraz  $6,5$  Hz, H24), 3,73 (1H, d,  $J = 5,4$  Hz, H21), 3,62 (1H, m, H22), 3,28 (1H, dd,  $J = 4,6$  oraz  $6,6$  Hz, H24), 3,24 - 3,15 (2H, m, ov, H3 oraz H28), 2,93 (1H, d,  $J = 9,0$  Hz, H28), 2,42 (1H, dd,  $J = 2,1$  oraz  $8,5$  Hz, H18), 2,34 (1H, t,  $J = 12,6$  Hz, H19), 2,03 (3H, s, -OCOCH<sub>3</sub> C4''), 2,00 (3H, s, -OCOCH<sub>3</sub> C6''), 1,97 (3H, s, -OCOCH<sub>3</sub> C3''), 1,78 (3H, s, -OCOCH<sub>3</sub> C2''), 1,53 (5H, m, ov), 1,33 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,08 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 0,88 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,82 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,80 - 0,70 (7H, m, ov, H5, -CH<sub>3</sub> H30 oraz -CH<sub>3</sub> H26).



<sup>13</sup>C NMR (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  [ppm]: 169,9 (C6'' -COCH<sub>3</sub>), 169,5 (C3'' -COCH<sub>3</sub>), 169,3 (C4'' -COCH<sub>3</sub>), 168,4 (C2'' -COCH<sub>3</sub>), 144,8 (C2'), 142,9 (C13), 122,5 (C3'), 122,1 (C12), 83,8 (C1''), 78,6 (C3), 76,8 (C21), 73,2 (C5''), 72,2 (C22 oraz C3''), 72,1 (C28), 70,5 (C4''), 67,5 (C5''), 66,7 (C16), 64,2 (C1'), 63,0 (C24), 61,8 (C6''), 55,4 (C5), 46,9 (C19), 46,2 (C7), 40,0 (C14), 39,6 (C18), 39,5 (C8), 39,4 (C1), 38,2 (C6), 33,4 (C15), 32,7 (C9), 29,9 (-CH<sub>3</sub> C29), 27,2 (C2), 26,7 (-CH<sub>3</sub> C27), 23,2 (C11), 22,9 (-CH<sub>3</sub> C23), 20,5 (-COCH<sub>3</sub> C6''), 20,4 (-COCH<sub>3</sub> C4''), 20,2 (-COCH<sub>3</sub> C3''), 19,9 (C2''-COCH<sub>3</sub> C2''), 18,7 (-CH<sub>3</sub> C30), 18,6 (C10), 16,2 (-CH<sub>3</sub> C26), 15,6 (-CH<sub>3</sub> C25).

[Otrzymywano produkt także bezpośrednio z **4b**]

Pochodną **4b** (1,0 g, 1,00 mmola) rozpuszczono w THF (90 mL) i metanolu (10 mL) w *RT*. Następnie dodano katalityczną ilość pTSA, mieszano dalej w *RT*. Po 1 godzinie kontrola TLC (układ CHCl<sub>3</sub>-iPrOH 95:5;  $R_f = 0,43$  – najprawdopodobniej mono-izopropylidenopochodna) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Mieszaninę reakcyjną przeniesiono do rozdzielacza i dodano wodę (50 mL). Ekstrahowano CHCl<sub>3</sub> (50 mL i 30 mL) a połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika przeprowadzono reakcję zdjęcia pozostałego mostka izopropylidenowego z monoizopropylidenopochodnej

w świeżych rozpuszczalnikach. Zamierzony efekt osiągnięto ( $R_f$  produktu = 0,20) otrzymując po ekstrakcji (postępowanie j.w.) 1,27 g surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 36 g; eluent:  $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 95:5  $\rightarrow$  90:10). Otrzymano frakcję 715 mg produktu (**7b**) o czystości 96,85% (wydajnością 77,9%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

#### 4.5.8 Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-4-O-benzylo-2,3,6-trideoksy- $\beta$ -L-lykso-heksapiranozą (**7c**)

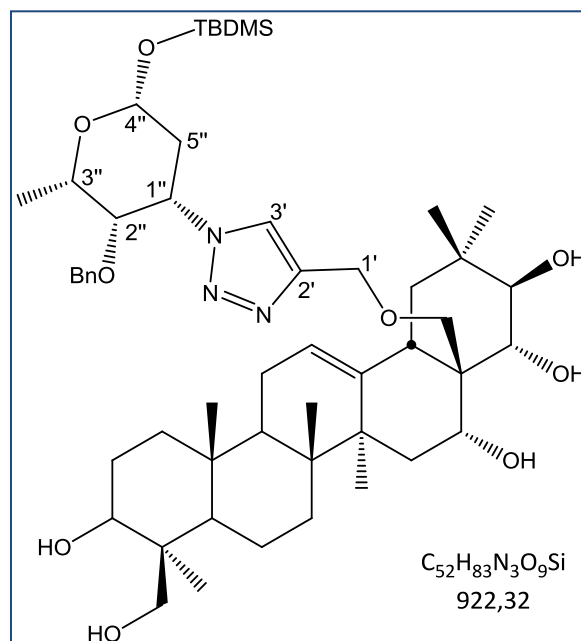
28-propargilprotoescygeninę (**6**, 100 mg, 0,18 mmola) rozpuszczono w *t*BuOH (8 mL) delikatnie podgrzewając. Następnie dodano 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-4-O-benzylo-2,3,6-trideoksy- $\beta$ -L-lykso-heksapiranozę (76 mg, 0,20 mmola) i wodę (4 mL), mieszano kilka minut w *RT*. Dodano roztwór  $\text{Cu}(\text{AcO})_2$  (0,8 mL, 0,072 mmola, roztwór 160 mg/10 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (1,4 mL, 0,108 mmola, roztwór 220 mg/10 mL wody). Mieszanina nabiera pomarańczowej barwy na kilka sekund, mętnieje i staje się mlecznobiała. Po 24 godzinach mieszanina staje się klarowna o barwie oliwkowej, kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 85:15;  $R_f$  produktu = 0,64) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (35 mL)(mieszanina mocno mętnieje) i ekstrahowano chloroformem (3  $\times$  25 mL) a połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2  $\times$  25 mL). Ponieważ w fazie wodnej nadal pozostała znaczna ilość produktu ekstrahowano  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2  $\times$  30 mL) (nadal pozostaje w fazie wodnej), następnie octanem etylu (2  $\times$  30 mL + solanka). Fazy organiczne połączono i wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 173 mg osadu surowego produktu.

Produkt oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 15 g; eluent:  $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 95:5  $\rightarrow$  90:10). Otrzymano frakcję 128 mg produktu (**7c**) o czystości 96,54% (wydajność 77,1%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**HRMS**  $\text{C}_{52}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_9\text{Si}$  (ESI): 944,5800  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**<sup>1</sup>H NMR** (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 8,07 (1H, s, H3'), 7,30 - 7,24 (3H, m, ov, -CH<sub>2</sub>Ph), 7,07 (3H, m, ov, -CH<sub>2</sub>Ph), 5,01 (1H, t, J = 3,0 Hz, H1''), 5,00 - 4,92 (2H, m, ov, H5'' oraz H12), 4,53 (1H, d, J = 12,6 Hz, H1'), 4,42 (1H, d, J = 12,6 Hz, H1'), 4,25 (C21-OH), 4,05 (dd, J = 3,0 oraz 7,8 Hz, -CH<sub>2</sub>Ph), 4,01 (1H, d, J = 10,8 Hz, H24), 3,95 (1H, d, J = 4,2 Hz, H22), 3,84 (1H, dd, J = 2,4 oraz 10,8 Hz, H3''), 3,70 - 3,64 (2H, m, ov, H2'' oraz H21), 3,56 (1H, d, J = 10,8 Hz, -CH<sub>2</sub>Ph), 3,40 - 3,30 (m, ov, H3, H16), 3,24 (1H, dd, J = 7,8 oraz



10,8 Hz, H24), 3,17 (1H, m, H24), 3,12 (1H, d, J = 9,0 Hz, H28), 2,88 (1H, d, J = 9,0 Hz, H28), 2,41 (1H, dd, J = 3,6 oraz 14,4 Hz, H18), 2,34 (1H, t, J = 13,2 Hz, H19), 2,00 (1H, m, ov, H4''), 1,80 - 1,35 (10H, m, ov, H1, H2, H6, H7, H9, H11, H15, H19), 1,25 (1H, m, ov, H6), 1,16 (4H, m, ov, -CH<sub>3</sub> H3' oraz H19), 1,07 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,05 (1H, m, H23), 0,94 - 0,86 (11H, m, ov, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, H1 oraz H9), 0,86 (H5), 0,83 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,81 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,78 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,61 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26), 0,10 (6H, m, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>); δ (ppm): 144,0 (C2'), 142,8 (C13), 137,5 (-CH<sub>2</sub>Ph), 128,1 (-CH<sub>2</sub>Ph), 128,0 (-CH<sub>2</sub>Ph), 127,6 (-CH<sub>2</sub>Ph), 122,9 (C3'), 121,9 (C12), 94,3 (C5''), 78,6 (C2''), 76,8 (C3), 76,7 (C21), 74,3 (-CH<sub>2</sub>Ph), 72,2 (C22), 71,6 (C3''), 70,5 (C28), 66,8 (C16), 64,0, 63,0 (C1'), 62,0 (C24), 58,2 (C1''), 55,3 (C5), 46,9 (C9), 46,1 (C19 oraz C17), 42,1 (C14), 40,7 (C18), 36,2 (C1), 35,3 (C20), 33,3, 33,0, 32,6 (C7), 29,9 (C29), 27,2 (C27), 26,6 (C23), 25,6 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25,5 (C2), 22,8 (C11), 18,7 (C30), 18,5 (C26), 17,7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 16,8 (-CH<sub>3</sub> C3''), 16,1 (C25), 15,6, -4,2 (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5,1 (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

[Otrzymywano produkt także bezpośrednio z **4c**]

Pochodną **4c** (1,15 g, 1,15 mmola) rozpuszczono w THF (90 mL) i metanolu (10 mL) w *RT*. Następnie dodano katalityczną ilość pTSA, mieszano dalej w *RT*. Po 2 godzinach kontrola TLC (układ CHCl<sub>3</sub>-iPrOH 95:5) wskazuje na nieprzereagowanie minimalnej ilość

substratu, widoczna plamka mono-izopropylidenopochodnej ( $R_f = 0.41$ ) oraz plamka produktu ( $R_f = 0.28$ ). Po nocy TLC – mono-izopropylidenopochodna wyczerpuje się niemal całkowicie.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (50 mL). Ekstrahowano  $\text{CHCl}_3$  (50 mL + 30 mL) a połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika podjęto próbę wyczerpania nieprzereagowanej mono-izopropylidenopochodnej w świeżych rozpuszczalnikach, zamierzony efekt osiągnięto otrzymując po ekstrakcji (postępowanie j.w.) 1,24 g surowego produktu.

Produkt oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 36 g; eluent:  $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 95:5  $\rightarrow$  90:10). Otrzymano frakcję 771 mg produktu (**7c**) o czystości 97,56% (wydajność 72,7%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

#### 4.5.9 Połączenie 28-propargiloprotoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-2,3-dideoksy- $\beta$ -D-arabino-heksopiranozą (**7d**)

28-propargiloprotoescygeninę (**6**, 100 mg, 0,18 mmola) i 3-azydo-1-O-tertbutylodimetylosililo-2,3-dideoksy- $\beta$ -D-arabino-heksopiranozę (61 mg, 0,20 mmola) rozpuszczono w *t*BuOH (8 mL) delikatnie podgrzewając. Następnie dodano wodę (4 mL) i mieszano w *RT* (klarowna bezbarwna mieszanina). Dodano roztwór  $\text{Cu}(\text{AcO})_2$  (0,8 mL, 0,072 mmola, roztwór 160 mg/10 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (1,4 mL, 0,108 mmola, roztwór 220 mg/10 mL wody). Mieszanina nabiera brązowej barwy na kilka sekund, następnie mętnieje i staje się mlecznobiała. Po 24 godzinach mieszanina klarowna, barwy oliwkowej, kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 85:15;  $R_f$  produktu = 0,23) wskazuje na wyczerpanie substratu.

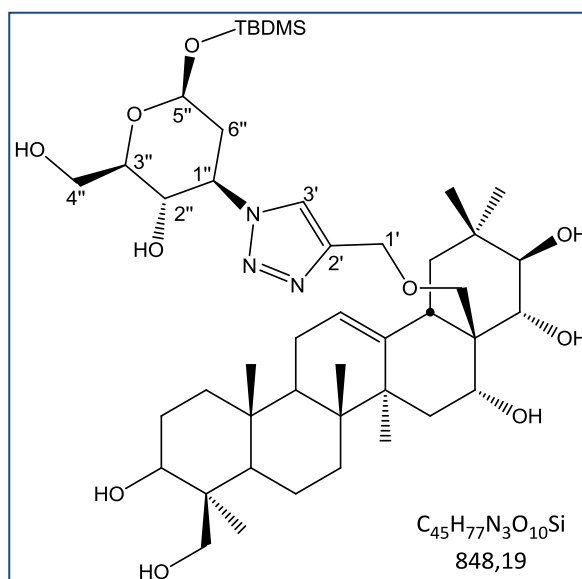
Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (30 mL) i ekstrahowano octanem etylu (3  $\times$  25 mL) a połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2  $\times$  25 mL), wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 185 mg surowego produktu.

Produkt oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 12 g; eluent:  $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 95:5  $\rightarrow$  90:10  $\rightarrow$  85:15). Otrzymano frakcje 120 oraz 58 mg produktu (**7d**)

o czystości 81,73 i 83,0% (wydajność 78,9%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 8,06

(1H, s, H3'), 5,18 (1H, d, J = 6,6 Hz, C2''-OH), 5,13 (1H, m, H12), 5,00 (1H, dd, J = 1,8 oraz 9,0 Hz, H5''), 4,96 (1H, d, J = 4,8 Hz, C3-OH), 4,60 (1H, m, H1''), 4,52 - 4,48 (2H, m, ov, H1' oraz C4''-OH), 4,41 (1H, d, J = 12,6 Hz, H1'), 4,26 (1H, d, J = 4,2 Hz, C16-OH), 4,04 (1H, dd, J = 3,0 oraz 7,8 Hz, C24-OH), 3,96 - 3,94 (2H, m, ov, H16 oraz C21-OH), 3,83 (1H, dd, J = 2,6 oraz 10,8 Hz, H24), 3,70



(ddd, J = 2,0, 5,2 oraz 11,6 Hz, H4''), 3,65 (1H, m, H22), 3,59 (1H, m, H2''), 3,54 (1H, m, H4''), 3,32 (m, ov, H3''), 3,25 (1H, m, H24), 3,20 - 3,10 (2H, m, ov, H3 oraz H28), 2,41 (1H, dd, J = 3,4 oraz 14,2 Hz, H18), 2,33 (1H, t, J = 12,6 Hz, H19), 2,15 (1H, m, H6''), 2,05 (1H, m, H6''), 1,77 - 1,72 (2H, m, ov, H11), 1,50 (2H, m, ov, H7 oraz H15), 1,32 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,17 (m, H15), 1,07 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 0,88 (9H, s, -SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,85 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,83 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,80 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,63 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26), 0,12 (6H, s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 143,6 (C2'); 142,9 (C13), 122,2 (C3'), 121,8 (C12), 94,4 (C5''), 78,6 (C3), 78,2 (C3''), 76,9 (C21), 72,4 (C22), 72,0 (C28), 69,0 (C2''), 66,7 (C16), 64,1 (C1'), 63,0 (C24), 61,6 (C1''), 60,9 (C4''), 55,3 (C5), 47,0 (C19), 46,1 (C7), 46,0 (C17), 42,1 (C4), 40,7 (C14), 39,5 (C18), 39,8 (C6''), 39,1 (C8), 38,1 (C1), 36,2 (C6), 35,3 (C20), 33,4 (C15), 32,7 (C9), 29,9 (-CH<sub>3</sub> C29), 27,2 (C2), 26,7 (-CH<sub>3</sub> C27), 25,6 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23,2 (C11), 22,9 (-CH<sub>3</sub> C23), 18,8 (-CH<sub>3</sub> C30), 18,5 (C10), 17,6 (-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 16,1 (-CH<sub>3</sub> C26), 15,7 (-CH<sub>3</sub> C25), -4,1 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5,2 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

[Otrzymywano produkt także bezpośrednio z **4d**]

Pochodną **4d** (1,18 g, 1,27 mmola) rozpuszczono w THF (90 mL) i metanolu (10 mL) w RT. Następnie dodano katalityczną ilość pTSA, mieszano dalej w RT. Po nocy kontrola TLC (układ CHCl<sub>3</sub>-iPrOH 95:5: R<sub>f</sub> mono-izopropylidenopochodnej = 0,19; układ CHCl<sub>3</sub>-iPrOH

85:15:  $R_f$  mono-izopropylidenopochodnej = 0,76) wskazuje na wyczerpanie substratu i dużo mono-izopropylidenopochodnej. Dodano pTSA (katalitycznie) i metanol (kilka mL), mieszano 24 godziny do wyczerpania mono-izopropylidenopochodnej.

Mieszaninę reakcyjną przeniesiono do rozdzielacza i dodano wodę (50 mL). Ekstrahowano  $\text{CHCl}_3$  (50 mL + 30 mL) a połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 1,24 g surowego produktu.

Produkt oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 30 g; eluent:  $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 95:5  $\rightarrow$  90:10  $\rightarrow$  85:15). Otrzymano frakcję 695 mg produktu (**7d**) o czystości 97,11% (wydajność 64,5%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

#### 4.5.10 Połączenie 28-propargilprotoescygeniny z 1,6-anhydro-2-azydo-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozą (**7e**)

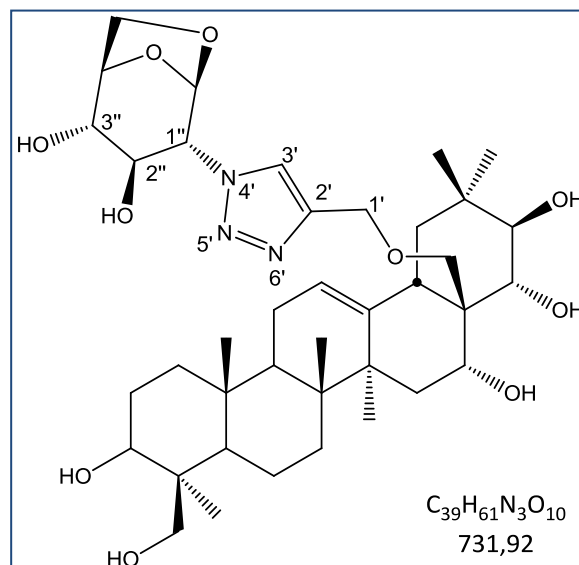
28-propargilprotoescygeninę (**6**, 200 mg, 0,37 mmola) oraz 1,6-anhydro-2-azydo-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozę (76 mg, 0,41 mmola) rozpuszczono w *t*BuOH (16 mL) lekko podgrzewając i dodano wodę (8 mL), mieszano w *RT* (klarowna bezbarwna mieszanina). Następnie dodano roztwór  $\text{Cu}(\text{AcO})_2$  (1,6 mL, 0,14 mmola, roztwór 160 mg/10 mL wody) oraz roztwór askorbinianu sodu (2,8 mL, 0,21 mmola, roztwór 220 mg/10 mL wody). Mieszanina nabiera brązowej barwy na kilka sekund, następnie barwa znika a mieszanina mętnieje. Po 24 godzinach mieszanina klarowna, barwy zielonej, kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 85:15,  $R_f$  produktu = 0,18; układ  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 80:20,  $R_f$  produktu = 0,32) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (50 mL) i ekstrahowano chloroformem (2  $\times$  50 mL i 25 mL) a połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2  $\times$  25 mL) i wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 231 mg surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie (żel krzemionkowy 20 g; eluent:  $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 90:10  $\rightarrow$  80:20  $\rightarrow$  70:30) otrzymując frakcję 81 mg produktu (**7e**) o czystości 96,90% (wydajność 29,9%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**MS**  $\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_9$  (ESI): 754,42  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO), δ [ppm]: 8,30 (1H, s, H3'), 5,69 (1H, d, J = 3,6 Hz, C3''-OH), 5,65 (1H, d, J = 4,2 Hz, C4''-OH), 5,35 (1H, s, H1''), 5,17 (1H, s, H12), 4,57 (1H, d, J = 3,0 Hz, H5''), 4,51 (2H, m, ov, H1' oraz H2''), 4,43 (1H, d, J = 7,2 Hz, H1'), 4,27 (1H, d, J = 4,8 Hz, C16-OH), 4,11 (1H, d, J = 7,2 Hz, H6''), 3,95 (2H, m, ov, H16 oraz C21-OH), 3,83 (1H, dd, J = 1,8 oraz 6,6 Hz, H24), 3,76 (1H, m, ov, H21), 3,70 (1H, t, J = 0,6 Hz, H3''), 3,66 - 3,63 (2H, m, ov, H22 oraz H6''), 3,59 (1H, t, J = 1,2 Hz, H4''), 3,27 (1H, dd, J = 7,8 oraz 10,8 Hz, H24), 3,16 (2H, m, ov, H3 oraz H28), 2,94 (1H, d, J = 8,4 Hz, H28), 2,45 (1H, dd, J = 4,2 oraz 14,4 Hz, H18), 2,34 (1H, t, J = 12,6 Hz, H19), 1,78 (1H, dd, J = 2,4 oraz 8,4 Hz, H11), 1,51 (1H, m, ov, H7), 1,32 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,07 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 0,93 (1H, m, ov, H19), 0,86 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,83 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,80 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,74 (1H, d, J = 12,0 Hz, H5), 0,70 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).



**<sup>13</sup>C NMR** (150 MHz, DMSO), δ [ppm]: 144,1 (C2'), 142,9 (C13), 123,8 (C3'), 122,0 (C12), 99,8 (C1''), 78,6 (C3), 76,9 (C21), 76,3 (C5'') 72,3 (C22), 72,1 (C28), 71,2 (C3''), 70,5 (C4''), 66,7 (C16), 64,9 (C6'') 64,3 (C1'), 63,0 (C24), 55,4 (C5), 47,0 (C19), 46,2 (C7), 42,1 (C4), 40,7 (C14), 39,4 (C18), 39,1 (C8), 38,2 (C1), 36,2 (C6), 35,3 (C20), 33,4 (C15), 32,7 (C9), 29,9 (-CH<sub>3</sub> C29), 27,2 (C2), 26,7 (-CH<sub>3</sub> C27), 23,2 (C11), 22,9 (-CH<sub>3</sub> C23), 18,8 (-CH<sub>3</sub> C30), 18,6 (C10), 16,2 (-CH<sub>3</sub> C26), 15,6 (-CH<sub>3</sub> C25).

**<sup>15</sup>N NMR** (60 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: -128,1 (N4'), -18,8 (N5'), -27,8 (N6').

#### 4.5.11 Połączenie 28-propargiloprotoscygeniny z 1-azydo-β-D-glukopiranozą (**8b**)

[Produkt otrzymywano z **4b**]

Pochodną **4b** (100 mg, 0,10 mmola) rozpuszczono w metanolu (10 mL) w RT (mieszanina nie rozpuszcza się całkowicie, nieznacznie mętna). Dodano pTSA (ilość katalityczna) -



mieszanina stała się całkowicie klarowna. Po 3 godzinach kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 85:15;  $R_f$  produktu = 0,51) wskazuje na wyczerpanie substratu i powstanie pochodnej **7b**.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano porcjami metanolan sodu w ilości koniecznej do uzyskania zasadowego pH (wobec uniwersalnego papierka wskaźnikowego). Kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-AcOH-woda 6:1,8:0,2:0,3;  $R_f$  produktu = 0,32) wskazuje na wyczerpanie pochodnej **7b**.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (10 mL) i ekstrahowano octanem etylu (15 mL) - fazy się nie podzieliły (odparowanie metanolu nie pomaga). Ekstrahowano cykloheksanonem (2 × 10 mL) - fazy podzieliły się. Fazy organiczne połączono, przemyto wodą (10 mL) a uzyskaną fazę wodną ekstrahowano 10 mL cykloheksanonu. Fazy organiczne połączono, wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu, następnie odsączono środek suszący i odparowano otrzymując 353 mg surowego produktu (**8b**, żółty gęsty olej). Próby oczyszczania przy użyciu preparatywnego HPLC dały wynik negatywny.

[Produkt otrzymywano z **7b**]

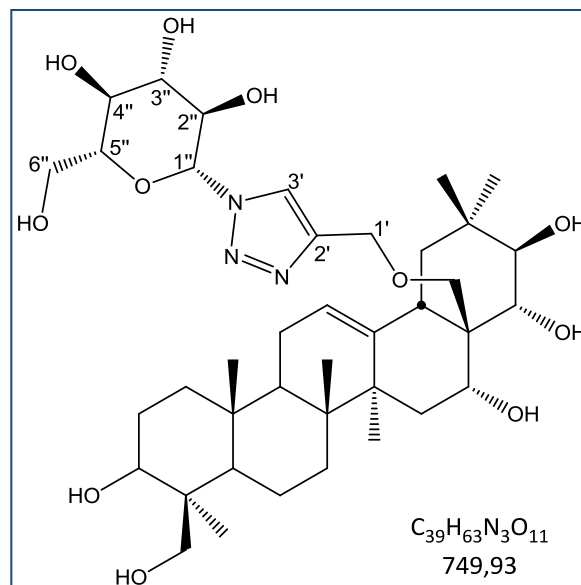
Pochodną **7b** (500 mg, 0,54 mmola) rozpuszczono w THF (25 mL) i metanolu (5 mL) w *RT*. Następnie dodano katalityczną ilość metanolanu sodu i mieszano dalej w *RT*. Kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-AcOH-woda 6:1,8:0,2:0,3;  $R_f$  produktu = 0,30) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (30 mL) i ekstrahowano octanem etylu (2 × 30 mL i 6 × 10 mL, słabo się ekstrahuje, nie jest możliwe całkowite wyekstrahowanie z wody), połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 361 mg osadu surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie (żel krzemionkowy 10 g; układ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 8:2). Otrzymano frakcję 330 mg produktu (**8b**) o czystości 95,35% (wydajność 81,5%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**HRMS**  $\text{C}_{39}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{11}$  (ESI): 772,43  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**<sup>1</sup>H NMR** (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 8,16 (1H, s, H3'), 5,51 (1H, d, J = 9,0 Hz, H1''), 5,35 (1H, d, J = 5,6 Hz, C2''-OH), 5,27 (1H, d, J = 4,5 Hz, C3''-OH), 5,23 (1H, t, J = 3,4 Hz, H12), 5,14 (1H, d, J = 5,3 Hz, C4''-OH), 4,95 (1H, d, J = 4,5 Hz, C3-OH), 4,62 (1H, t, J = 5,3 Hz, C6''-OH), 4,50 (1H, d, J = 11,6 Hz, H1'), 4,44 (1H, d, J = 12,0 Hz, H1'), 4,30 (1H, d, J = 4,5 Hz, C16-OH), 3,98 - 3,95 (2H, m, ov, H16 oraz C21-OH), 3,83 (1H, dd, J = 2,6 oraz 10,5 Hz, H24), 3,79 - 3,73 (2H, m, ov, H2''



oraz H21), 3,70 (1H, m, H6''), 3,62 (1H, m, H22), 3,47 - 3,42 (2H, m, ov, H5'' oraz H6''), 3,38 (1H, m, H3''), 3,29 - 3,21 (3H, m, ov, H4'', H24 oraz H28), 3,17 (1H, d, J = 5,3 Hz, H3), 3,00 (1H, d, J = 9,0 Hz, H28), 2,47 (1H, m, C18), 2,36 (1H, t, J = 12,4 Hz, H19), 1,66 - 1,50 (3H, m, ov, 2x H2 oraz H7), 1,35 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,08 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 0,95 (1H, dd, J = 3,8 oraz 12,0 Hz, H19), 0,88 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,83 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,82 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26), 0,79 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,76 (1H, d, J = 11,2 Hz, H5).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 144,1 (C2'), 143,1 (C13), 122,6 (C3'), 122,1 (C12), 87,4 (C1''), 79,9 (C5''), 78,6 (C3), 77,0 (C3''), 76,9 (C21), 72,8 (C28), 72,4 (C22), 72,1 (C2''), 69,6 (C4''), 66,7 (C16), 64,6 (C1'), 63,0 (C24), 60,7 (C6''), 55,4 (C5), 47,0 (C19), 46,3 (C17), 46,2 (C7), 42,1 (C4), 40,8 (C14), 39,5 (C18), 39,2 (C8), 38,2 (C1), 36,3 (C6), 35,4 (C20), 33,5 (C15), 32,7 (C9), 29,9 (-CH<sub>3</sub> C29), 27,2 (C2), 26,7 (-CH<sub>3</sub> C27), 23,2 (C11), 22,9 (-CH<sub>3</sub> C23), 18,9 (-CH<sub>3</sub> C30), 18,6 (C10), 15,7 (-CH<sub>3</sub> C25).

#### 4.5.12 Usuwanie zabezpieczeń z połączenia 28-propargiloprotoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutyldimetylosililo-4-O-benzylo-2,3,6-trideoksy-β-L-likso-heksapiranozq

[Produkt otrzymywano z **4c**]

Pochodną **4c** (100 mg, 0,10 mmola) rozpuszczono w THF (10 mL) w RT. Dodano pTSA (ok. 5 mg), mieszanina zmieniła lekko barwę z czerwono-pomarańczowej

na pomarańczową. Po 30 minutach kontrola TLC wskazuje, że reakcja nie zachodzi. Dodano do mieszaniny reakcyjnej kilka kryształków pTSA i MeOH (2 mL, jako donor protonów), kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 85:15;  $R_f$  produktu = 0,56) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano fluorek tetrabutylamonowy ( $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-\times 3\text{H}_2\text{O}$ , ilość katalityczna) i mieszano dalej w *RT*. Po 3 godzinach kontrola TLC wykazuje, że reakcja nie zachodzi. Dodano do mieszaniny 1M  $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$  (0,7 mL) i mieszano przez noc. Kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 85:15,  $R_f$  produktu = 0,24) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (15 mL) i ekstrahowano octanem etylu ( $3 \times 10$  mL). Połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 177 mg surowego produktu (gęsty żółty olej), oczyszczanie możliwe tylko za pomocą preparatywnego HPLC – bardzo niska wydajność.

[Produkt otrzymywano z **7c**]

Pochodną **7c** (500 mg, 0,54 mmola) rozpuszczono w THF (30 mL) w *RT*. Następnie dodano 1M fluorku tetrabutylamonowego (3,5 mL), mieszanina reakcyjna zmętniała, mieszano dalej w *RT*. Kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 85:15;  $R_f$  produktu = 0,23) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (30 mL) i ekstrahowano octanem etylu ( $2 \times 30$  mL) a połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 499 mg surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie (żel krzemionkowy 15 g; eluent:  $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 90:10  $\rightarrow$  85:15). Otrzymano frakcję 200 mg o czystości 97,10% (wydajność 45,9%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc. Analiza wskazała na rozpad produktu.

#### 4.5.13 Usuwanie zabezpieczeń z połączenia 28-propargiloprotoescygeniny z 3-azydo-1-O-tertbutyldimetylosililo-2,3-dideoksy- $\beta$ -D-arabino-heksopiranozą

[Produkt otrzymywano z **4d**]

Pochodną **4d** (100 mg, 0.10 mmola) rozpuszczono w THF (10 mL) i metanolu (2 mL) w *RT*. Dodano pTSA (ok. 10 mg). Pozostawiono na noc. Kontrola TLC (układ  $\text{CHCl}_3$ -iPrOH 85:15;  $R_f$  produktu = 0,16) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano 1M  $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$  (0,5 mL) i mieszano przez 3 godziny. Kontrola TLC (układ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 75:25,  $R_f$  produktu = 0,55) wskazuje na wyczerpanie **7d**.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (10 mL) i ekstrahowano octanem etylu ( $3 \times 10$  mL). Fazy organiczne połączono i suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Odsączono środek suszący i odparowano otrzymując 139 mg surowego produktu, oczyszczanie możliwe tylko za pomocą preparatywnego HPLC – bardzo niska wydajność.

[Produkt otrzymywano z **7d**]

Pochodną **7d** (500 mg, 0,59 mmola) rozpuszczono w THF (30 mL) w *RT*. Następnie dodano 1M fluorku tetrabutylamonowego (3,5 mL), mieszanina reakcyjna zmętniała. Mieszano dalej w *RT*. Kontrola TLC (układ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 85:15;  $R_f$  produktu = 0,55) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (30 mL) i ekstrahowano octanem etylu ( $2 \times 30$  mL) a połączone fazy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano 519 mg osadu surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie (żel krzemionkowy 15 g; układ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 9:1). Otrzymano frakcję 120 mg o czystości powyżej 99% (wydajnością 27,7%). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc. Analiza wskazała na rozpad produktu.

#### 4.5.14 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeniny z estrem dietylowym kwasu azydometylofosforowego (**5a**)

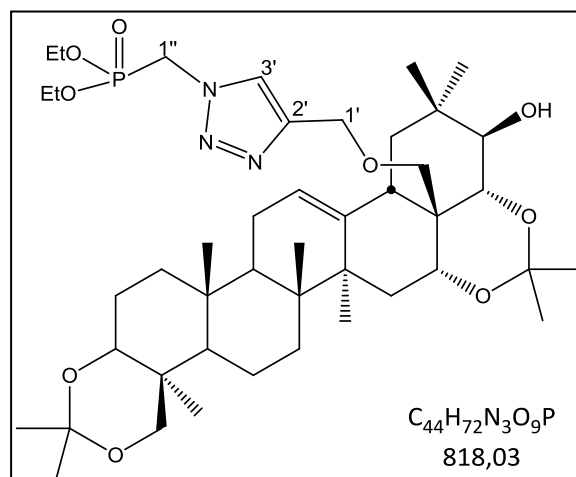
3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeninę (**3a**, 260 mg, 0,42 mmola) i ester dietylowy kwasu azydometylofosforowego (97 mg, 0,50 mmola) rozpuszczono w THF (20 mL) i dodano wody (10 mL). Następnie dodano świeżo przygotowane roztwory  $\text{Cu}(\text{AcO})_2$  (1,94 mL, 0,17 mmola, roztwór 48 mg/3 mL wody) oraz askorbinianu sodu (3,05 mL, 0,25 mmola, roztwór 88 mg/4 mL wody). Mieszanina klarowna o barwie niebieskiej nabiera brązowej barwy na kilka sekund, po czym traci ciemną barwę i mętnieje. Po kilku minutach zmętnienie zanika, mieszanina barwy jasnożółtej, kontrola TLC (układ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -*i*PrOH 95:5 –  $R_f$  produktu = 0,29) wskazuje na całkowite wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (30 mL) i ekstrahowano chlorkiem metylenu ( $2 \times 25$  mL + solanka). Połączone fazy organiczne zatężono otrzymując 360 mg żółtego osadu surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie (żel krzemionkowy 10 g; eluent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2$ -*i*PrOH 98:2  $\rightarrow$  95:5). Otrzymano trzy frakcje, z których jedna zawierała produkt (**5a**) w postaci białego osadu o czystości wystarczającej do potwierdzenia tożsamości (NMR, MS). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**HRMS** (ESI): 840,4904  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**$^1\text{H}$  NMR** (600 Hz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  [ppm]: 7,76 (1H, s, H3'), 5,28 (1H, t,  $J = 4,2$  Hz, H12), 4,70 - 4,58 (2H, m, ov, H1' oraz H1''), 4,11 (4H, m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 4,04 (1H, d,  $J = 13,8$  Hz, H24), 3,91 (1H, d,  $J = 12,6$  Hz, H21), 3,85 (1H, d,  $J = 12,6$  Hz, H22), 3,56 (1H, d,  $J = 10,2$  Hz, H28), 3,46 (1H, dd,  $J = 5,4$  oraz 10,8 Hz, H3), 3,38 (1H, dd, H16), 3,30 (1H, d,  $J = 9,6$  Hz, H28), 3,23 (1H, d,  $J = 13,8$  Hz,



2,63 (1H, dd,  $J = 4,8$  oraz 16,8 Hz, H18), 2,10 - 1,96 (2H, m, ov, H2 oraz H15), 1,94 - 1,86 (2H, m, ov, H11 oraz H19), 1,82 - 1,70 (2H, m, H2 oraz H11), 1,70 - 1,50 (5H, m,

ov, H1, H7, H9, H15), 1,46 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,45 (4H, m, ov, H9 oraz -CH<sub>3</sub>), 1,38 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,35 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,30 (6H, m, ov, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,22 (3H, s, ov, -CH<sub>3</sub> H23), 1,19 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,14 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 1,10 - 1,00 (4H, m, ov, H1, -CH<sub>3</sub> H29), 0,90 (1H, m, ov, H5), 0,85 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,81 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

<sup>13</sup>C NMR (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 145,9 (C2'), 140,2 (C13), 123,2 (C12), 122,8 (C3'), 99,1 (C31), 98,8 (C34), 77,3 (C3 oraz C21), 74,1 (C22), 71,5 (C28), 69,2 (C16), 64,6 (C1'), 63,8 (C24), 63,4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 53,7 (C5), 47,5 (C7), 46,4, 45,2 (C1''), 44,3 (C19), 43,8 (C17), 41,8, 41,6 (C18), 40,2 (C8), 37,4 (C4), 36,5 (C1), 36,3 (C6), 36,2 (C15), 35,1 (C20), 32,4 (C9), 30,8 (-CH<sub>3</sub>), 29,7 (-CH<sub>3</sub> C29), 28,8 (-CH<sub>3</sub> C27), 27,7 (-CH<sub>3</sub>), 25,5 (-CH<sub>3</sub> C23), 25,3 (-CH<sub>3</sub>), 24,7 (C2), 24,4 (-CH<sub>3</sub>), 23,1 (C11), 18,8 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,9, 17,1 (-CH<sub>3</sub> C25), 16,7 (-CH<sub>3</sub> C30), 16,4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 16,3.

<sup>31</sup>P NMR (200 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 12,76.

#### 4.5.15 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeniny z estrem dietylowym kwasu azydoetylofosforowego (**5b**)

3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeninę (**3a**, 260 mg, 0,42 mmola) i ester dietylowy kwasu azydoetylofosforowego (104 mg, 0,50 mmola) rozpuszczono w THF (20 mL) i dodano wody (10 mL). Następnie dodano świeżo przygotowane roztwory Cu(AcO)<sub>2</sub> (1,94 mL, 0,17 mmola, roztwór 48 mg/3 mL wody) oraz askorbinianu sodu (3,05 mL, 0,25 mmola, roztwór 88 mg/4 mL wody). Mieszanina klarowna o barwie niebieskiej nabiera brązowej barwy na kilka sekund, po czym traci ciemną barwę i mętnieje. Po kilku minutach zmętnienie zanika, mieszanina barwy jasnozielonej, kontrola TLC (układ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-iPrOH 95:5 – R<sub>f</sub> produktu = 0,24) – niewielka ilość substratu pozostaje nieprzereagowana, dodanie po 1 mL Cu(AcO)<sub>2</sub> oraz AscNa nie zmieniło stopnia przereagowania.

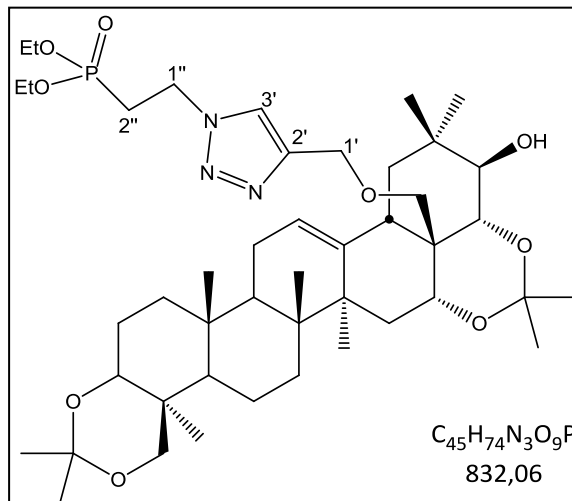
Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (30 mL) i ekstrahowano chlorkiem metylenu (2 × 25 mL + solanka). Połączone fazy organiczne zatężono otrzymując 376 mg pomarańczowego osadu surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 14 g; eluent: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-iPrOH 98:2 → 95:5). Otrzymano dwie frakcje, z których jedna zawierała produkt (**5b**) w postaci

białego osadu o czystości wystarczającej do potwierdzenia tożsamości (NMR, MS).  
Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**HRMS** (ESI): 854,5060  $[M+Na]^+$

**$^1H$  NMR** (600 Hz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  [ppm]: 7,60 (1H, s, H3'), 5,23 (1H, t,  $J = 3,6$  Hz, H12), 4,68 - 4,58 (2H, m, ov, H1' oraz H1''), 4,11 (4H, m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,04 (1H, m, H24), 3,91 (1H, d,  $J = 10,2$  Hz, H21), 3,88 (1H, d,  $J = 10,2$  Hz, H22), 3,54 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, H28), 3,45 (1H, dd,  $J = 4,2$  oraz  $9,0$  Hz, H3), 3,36 (1H, dd, H16), 3,29 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H28), 3,24 (1H, d,  $J = 11,4$  Hz, H24), 2,62 (1H, dd, H18), 2,46 -



2,38 (2H, m, H2''), 2,06 - 2,01 (2H, m, ov, H2 oraz H15), 1,98 - 1,86 (2H, m, ov, H11 oraz H19), 1,77 - 1,72 (2H, m, H2 oraz H11), 1,70 - 1,50 (5H, m, ov, H1, H7, H9, H15), 1,46 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,44 (4H, m, ov, H9 oraz -CH<sub>3</sub>), 1,37 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,34 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,32 (6H, m, ov, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,22 (3H, s, ov, -CH<sub>3</sub> H23), 1,19 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,13 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 1,10 - 1,00 (4H, m, ov, H1, -CH<sub>3</sub> H29), 0,90 (1H, m, H5), 0,85 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,79 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

**$^{13}C$  NMR** (150 Hz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  [ppm]: 145,5 (C2'), 140,1 (C13), 122,8 (C12), 122,5 (C3'), 99,2 (C31), 98,8 (C34), 77,0 (C3 oraz C21), 74,1 (C22), 71,2 (C28), 69,2 (C16), 64,6 (C1'), 63,7 (C24), 62,2 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 53,7 (C5), 47,5 (C7), 44,5 (C1''), 44,2 (C19), 43,8 (C17), 41,8, 41,6 (C18), 40,2 (C8), 37,4 (C4), 36,5 (C1), 36,3 (C6), 36,2 (C15), 35,1 (C20), 32,4 (C9), 30,9 (-CH<sub>3</sub>), 29,7 (-CH<sub>3</sub> C29), 28,8 (-CH<sub>3</sub> C27), 27,8 (-CH<sub>3</sub>), 26,8 (C2''), 26,0 (-CH<sub>3</sub> C23), 25,5 (-CH<sub>3</sub>), 24,8 (C2), 24,5 (-CH<sub>3</sub>), 23,1 (C11), 18,8 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,1 (-CH<sub>3</sub> C25), 16,7 (-CH<sub>3</sub> C30), 16,4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

**$^{31}P$  NMR** (200 Hz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  [ppm]: 22,45.

#### 4.5.16 Połączenie 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeniny z estrem dietylowym kwasu azydopropylofosforowego (**5c**)

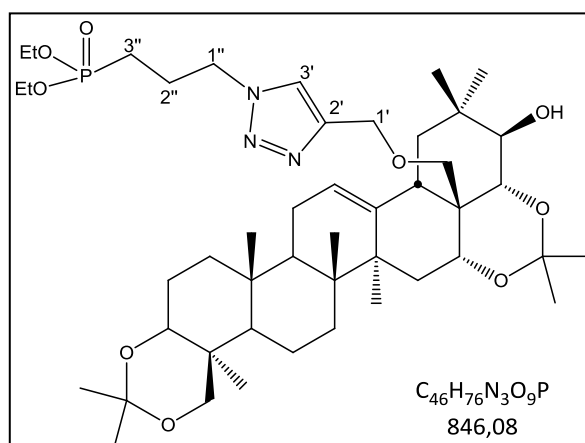
3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-propargiloprotoescygeninę (**3a**, 260 mg, 0,42 mmola) i ester dietylowy kwasu azydopropylofosforowego (111 mg, 0,50 mmola) rozpuszczono w THF (20 mL) i dodano wody (10 mL). Następnie dodano świeżo przygotowane roztwory  $\text{Cu}(\text{AcO})_2$  (1,94 mL, 0,17 mmola, roztwór 48 mg/3 mL wody) oraz askorbinianu sodu (3,05 mL, 0,25 mmola, roztwór 88 mg/4 mL wody). Mieszanina klarowna o barwie niebieskiej nabiera brązowej barwy na kilka sekund, po czym traci ciemną barwę i mętnieje. Po kilku minutach zmętnienie zanika, mieszanina barwy zielonej, kontrola TLC (układ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -*i*PrOH 95:5 –  $R_f$  produktu = 0,22) – niewielka ilość substratu pozostaje nieprzereagowana, dodanie po 1 mL  $\text{Cu}(\text{AcO})_2$  oraz AscNa nie zmieniło stopnia przereagowania.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (30 mL) i ekstrahowano chlorkiem metylenu ( $2 \times 25$  mL + solanka). Połączone fazy organiczne zatężono otrzymując 380 mg brunatno-pomarańczowego osadu surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie: żel krzemionkowy 15 g; eluent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2$ -*i*PrOH 98:2  $\rightarrow$  95:5). Otrzymano dwie frakcje, z których jedna zawierała produkt (**5c**) w postaci białego osadu o czystości wystarczającej do potwierdzenia tożsamości (NMR, MS). Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**HRMS** (ESI): 868,5217  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**$^1\text{H}$  NMR** (600 Hz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  [ppm]: 7,60 (1H, s, H3'), 5,24 (1H, m, H12), 4,70 - 4,60 (2H, m, ov, H1' oraz H1''), 4,50 - 4,40 (2H, t,  $J = 8,4$  Hz, H3''), 4,15 - 4,05 (4H, m, ov,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 4,00 (1H, m, ov, H24), 3,91 - 3,88 (2H, m, H21 oraz H22), 3,53 (1H, d,  $J = 10,2$  Hz, H28), 3,45 (1H, dd,  $J = 4,8$  oraz 10,8 Hz, H3), 3,37 (1H, m, H16), 3,30 (1H, d,  $J = 10,2$  Hz, H28), 3,23 (1H, d,  $J = 13,8$  Hz, H24), 2,61 (1H, dd, H18), 2,30 - 2,20 (2H, m, H2''), 2,08 - 1,98 (2H, m, ov, H2 oraz H15), 1,90 - 1,85 (2H, m, ov, H11 oraz H19), 1,84 -





1,68 (2H, m, ov, H2 oraz H11), 1,67 - 1,48 (6H, m, ov, H1, H7, H9, H15), 1,46 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,44 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,37 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,34 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,33 (6H, m, ov, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,21 (3H, s, ov, -CH<sub>3</sub> H23), 1,20 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,14 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 1,08 - 1,00 (4H, m, ov, H1, -CH<sub>3</sub> H29), 0,91 (1H, m, H5), 0,85 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,80 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 145,4 (C2'), 140,1 (C13), 122,7 (C12), 122,5 (C3'), 99,1 (C31), 98,7 (C34), 77,4 (C3), 77,2 (C21), 76,9, 74,0 (C22), 71,1 (C28), 69,1 (C16), 64,5 (C1'), 63,9 (C24), 61,8 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 53,6 (C5), 49,9, 47,4 (C7), 44,2 (C1''), 43,7 (C19), 42,5 (C17), 41,7, 41,5 (C18), 40,1 (C8), 37,4 (C4), 36,5 (C1), 36,2 (C6), 36,1 (C15), 35,1 (C20), 32,3 (C9), 30,8 (-CH<sub>3</sub>), 29,7 (-CH<sub>3</sub> C29), 28,7 (-CH<sub>3</sub> C27), 27,7 (-CH<sub>3</sub>), 26,0 (C2''), 25,5 (-CH<sub>3</sub> C23), 25,3 (-CH<sub>3</sub>), 24,7 (C2), 24,4 (-CH<sub>3</sub>), 23,6, 23,1 (C11), 18,8 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,0 (-CH<sub>3</sub> C25), 16,8 (-CH<sub>3</sub> C30), 16,4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (200 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 26,95.

#### *4.6 28-allilo-3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-protoescygenina oraz 21-allilo-3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-protoescygenina*

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 500 mg, 0,85 mmola, 93,40%) oraz wodorek sodu (60%, 61 mg, 2,55 mmola) rozpuszczono w THF (60 mL, suszony znad sodu) i ogrzewano do 50-55°C przez 30 minut. Następnie dodano bromek allilu (206 mg, 1,7 mmola), ogrzewano przez 15 minut. Następnego dnia (po nocy mieszanina mętna, barwy różowo-brązowej) ponownie ogrzewano przez godzinę. Kontrola TLC (układ: heksan-AcOEt 1:1, R<sub>f</sub> produktu = 0,72) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny dodano wodę (60 mL) i ekstrahowano chloroformem (2 × 50 mL), następnie połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2 × 50 mL). Fazę organiczną zatężono otrzymując 524 mg osadu (pianka) surowego produktu mieszaniny 28-O- i 21-O-allilopochodnej o czystości HPLC 74,36% (produkt poboczny - 24,89% to najprawdopodobniej 21-O-allilopochodna). Praktyczny brak różnicy polarności między produktami reakcji uniemożliwia rozdział chromatograficzny.

#### 4.7 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-(trifenylometylo)-protoescygenina

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola) rozpuszczono w pirydynie (10 mL) i ochłodzono do ok. 0°C i w atmosferze gazów obojętnych dodano halogenek (72 mg – chlorek, 84 mg – bromek; 0,26 mmola) oraz katalitycznie DMAP (4 mg, 0,03 mmola). Odstawiono łaźnię chłodzącą, mieszanina powróciła do RT (klarowna mieszanina z chlorkiem, z bromkiem zmętnienie znikające po kilkadziesiąt minutach). Kontrola TLC (układy: heksan-AcOEt 6:1 i CHCl<sub>3</sub>-izorpopanol 95:5) wskazuje na brak postępu reakcji.

#### 4.8 28-(tert-butyldifenylosililo)-3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-proteoscygenina

A.

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola, 89,77%), imidazol (15 mg, 0,22 mmola) rozpuszczono w THF (suchy, 6 mL) w temperaturze pokojowej i schłodzono do 0-2°C. Następnie wkroplono powoli chlorek tert-butyldifenylosililowy (55 mg, 0,22 mmola) rozpuszczony w THF (suchy, 4 mL), otrzymując nieznacznie mętną mieszaninę. Odstawiono łaźnię chłodzącą i mieszano w RT. Kontrola TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-iPrOH 95:5) wskazuje, że reakcja nie zachodzi, nawet pomimo długotrwałego ogrzewania w temperaturze wrzenia.

B.

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 2,5 g, 1,0 mmola), imidazol (1,16 g, 4,0 mmola) rozpuszczono w DMF (suchy, 50 mL) w temperaturze pokojowej. Następnie dodano chlorek tert-butyldifenylosililowy (3,5 g, 3,0 mmola) i jeszcze 20 mL DMF otrzymując klarowny roztwór. Kontrola TLC (układ: heksan-AcOEt 5:1) wskazuje, że substrat został niemal całkowicie wyczerpany.

Mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem (50 mL) – wytrąca się osad złej jakości, dlatego ponownie rozpuszczono w heksanie (100 mL), dodano 100 mL wody i przeniesiono do rozdzielacza, ekstrahowano heksanem (3 × 100 mL), fazę organiczną przemyto 5% wodorowęglanem sodu (100 mL). Połączone fazy organiczne suszono nad bezwodnym

siarczanem sodu, odsączono środek suszący i odparowano otrzymując surowego produktu w postaci gęstego oleju.

Rozdzielano chromatograficznie (eluent: heksan → heksan-AcOEt 7:1 → 6:1 → 5:1). Otrzymane frakcje będące na TLC jedną plamą po analizie HPLC okazują się mieszaniną dwóch związków.

#### 4.9 28-(*tert*-butylodimetylosililo)-3,24;16,22-*O,O*-diizopropylideno-*protoescygenina*

3,24;16,22-*O,O*-diisopropylidenoprotoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola, 89,77%), imidazol (15 mg, 0,22 mmola) i chlorek *tert*-butylodimetylosililowy (31 mg, 0,20 mmola) rozpuszczono w THF (suchy, 10 mL) w temperaturze pokojowej i mieszano (mętna mieszanina). Kontrola TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-*i*PrOH 95:5) wskazuje, że reakcja nie zachodzi. Ogrzewano we wrzeniu przez ok. 7 godzin, reakcja nadal nie zachodzi. Dodano DMF (2-3 mL), mieszanina klarowna a reakcja postępuje (jeden widoczny na TLC produkt).

Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza, następnie dodano wodę (20 mL). Ekstrahowano CHCl<sub>3</sub> (2 × 10 mL). Połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (20 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu, odsączono środek suszący i odparowano otrzymując 143 mg surowego osadu. Analiza LC-MS surowego produktu nie potwierdziła uzyskania spodziewanego produktu (produkt ulega rozpadowi niedługo po izolacji).

#### 4.10 28-benzylo-3,24;16,22-*O,O*-diizopropylidenoprotoscygenina (**9**)

3,24;16,22-*O,O*-diisopropylidenoprotoscygeninę (**2a**, 10 g, 16,6 mmola) oraz bromek *tetra*-butyloamoniowy (2,75 g, 8,52 mmola) rozpuszczono w THF (250 mL). Następnie dodano 33% roztwór KOH (100g KOH/200 mL wody) i mieszano w *RT* (mieszanina reakcyjna mętnieje – widoczne 2 fazy). Wkroplono bromek benzylu (3,21 g, 2,23 mL, 18,74 mmola) rozcieńczony w THF (50 mL), po czym mieszano dalej w *RT* (mieszanina staje się klarowna i nabiera żółtej barwy). Postęp reakcji kontrolowano TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 4:1; R<sub>f</sub> produktu = 0,71) – po 20 godzinach substrat nie uległ wyczerpaniu.

Dodano bromek benzylu (0,41 mL) i mieszano dalej w RT. Po 1,5 godzinie substrat wyczerpany.

Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza, następnie dodano wodę (250 mL). Ekstrahowano chloroformem (2 × 200 mL). Połączone fazy organiczne przemyto wodą (250 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu, odsączono środek suszący i odparowano otrzymując ok. 15 g surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie (300 g żelu krzemionkowego, eluent: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 95:5 → 9:1). Otrzymano frakcję 4,59 g produktu o czystości >90%. Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 7,33

(5H, m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5,14 (1H, m, H12), 4,52

(1H, d, J = 12,0 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 4,39 (1H, d,

J = 12,6 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 4,29 (1H, d, J = 4,8,

C16-OH), 3,92 (1H, m, H24), 3,89 (1H, m,

H22), 3,68 (1H, dd, J = 5,4 oraz 9,6 Hz, H21),

3,45 (1H, m, H16), 3,35 (1H, m, ov, H3), 3,34

(1H, m ov, H28), 3,21 (1H, d, J = 8,4 Hz,

H28), 3,14 (1H, d, J = 11,4 Hz, H24), 2,48 (1H, m, H18), 1,91 (3H, m, ov, H2 oraz H19), 1,79

(1H, m, H11), 1,65 (1H, m, H11), 1,62 (1H, m, H2), 1,49 (1H, m, ov, H1), 1,48, 1,46 (1H, m,

ov, H7), 1,41, 1,36, 1,28, 1,20 (1H, m, ov, H19), 1,12 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,11 (3H, s, -CH<sub>3</sub>

H23), 1,04 (3H, m, -CH<sub>3</sub> H25), 1,00 (1H, m, H1), 0,93 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,86 (1H, dd, J = 6,6

oraz 13,8 Hz, H5), 0,78 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,65 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>); δ (ppm): 140,4 (C13), 138,4 - 127,4 (-CH<sub>2</sub>-Ph), 122,1 (C12),

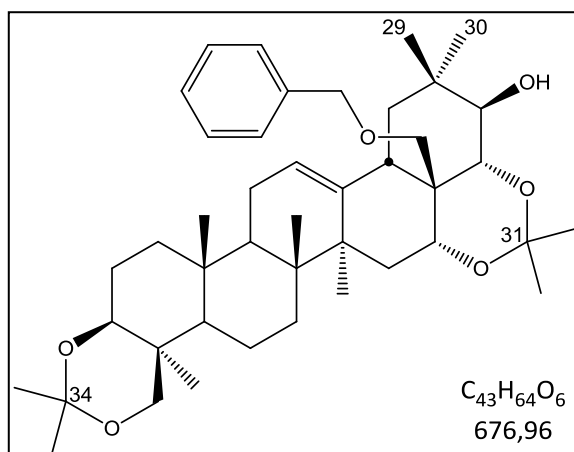
98,1 (C31), 98,0 (C34), 76,0 (C3), 75,6 (C21), 72,6 (C22), 72,3 (-CH<sub>2</sub>-Ph), 70,9 (C28), 68,3

(C16), 62,8 (C24), 53,0 (C5), 46,8 (C7), 44,5 (C19), 42,7 (C17), 41,1 (C14), 41,0 (C18), 39,5

(C8), 36,8 (C4), 36,1 (C1), 35,8 (C6), 35,4 (C20), 34,8 (C15), 32,1 (C9), 30,3 (C29), 30,3 (-CH<sub>3</sub>

C29), 28,0 (-CH<sub>3</sub> C27), 27,8 – 23,7 (-CH<sub>3</sub> 32, 33, 35 oraz 36), 25,7 (C23), 24,4 (C2), 22,6

(C11), 18,2 (-CH<sub>3</sub> C30), 18,1 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,5 (C10), 16,6 (-CH<sub>3</sub> C25).



#### 4.11 28-benzylo-16,22-O,O-izopropylidenoprotoscygenina (**10**)

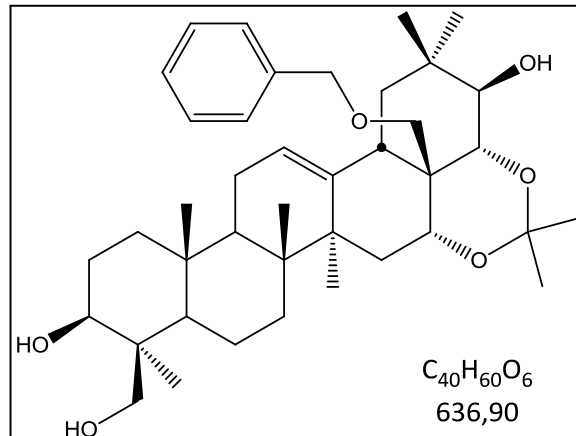
28-benzylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeninę (**9**, 3 g, 4,43 mmola) rozpuszczono w THF (50 mL), po czym rozpoczęto wkraplanie 1M chlorowodoru w THF (1,5 mL HCl/50 mL THF). Kontrola TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 6:4; R<sub>f</sub> produktu mono-odbezpieczonego = 0,31; R<sub>f</sub> produktu di-odbezpieczonego = 0,06) po wkropleniu 40 mL wykazała obecność nieprzereagowanego substratu, powstanie w przewodzie głównego produktu oraz produktu bez izopropylidenowych elementów. Dodano 10 mL roztworu kwasu – substrat nadal pozostaje w niewielkiej ilości, dodano 0,2 mL roztworu kwasu po czym zakończono reakcję dodając trietyloaminę (0,25 mL).

Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza, następnie dodano wodę (150 mL). Ekstrahowano chloroformem (2 × 50 mL). Fazę organiczną odparowano otrzymując ok. 3,16 g surowego produktu w postaci pianki.

Oczyszczano chromatograficznie (110 g żelu krzemionkowego, eluent: CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 95:5 → 9:1 → 8:2). Otrzymano frakcję 1,24 g produktu (**10**) o czystości >90%. Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

<sup>1</sup>H NMR (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]:

7,31 (5H, m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5,12 (1H, m, H12), 4,95 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, C3-OH), 4,53 (1H, d, *J* = 12,6 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 4,38 (1H, d, *J* = 12,0 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 4,27 (1H, d, *J* = 4,8, C16-OH), 4,07 (1H, dd, *J* = 3,0 oraz 10,2 Hz, C24-OH), 3,88 (1H, d, *J* = 9,0 Hz H22), 3,82 (1H, dd, *J* = 3,0 oraz 10,8 Hz, H24), 3,69 (1H, dd, *J* = 5,4 oraz



9,0 Hz, H21), 3,43 (1H, m, H16), 3,35 (1H, m, ov, H28), 3,28 (1H, dd, *J* = 7,8 oraz 10,8 Hz, H24), 3,20 (1H, m, ov, H28), 3,16 (1H, m, ov, H3), 2,50 (1H, m, H18), 1,92 (1H, m, ov, H15), 1,91 (1H, m, ov, H19), 1,78 (1H, m, H11), 1,62 (1H, m, ov, H2), 1,60 (1H, m, ov, H11), 1,56 (1H, m, ov, H10), 1,54 (1H, m, ov, H2), 1,50 (1H, m, ov, H1), 1,48 (1H, m, ov, H15), 1,37 (1H, m, ov, H10), 1,36 (1H, s, H9), 1,35 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H32), 1,27 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H33), 1,21 (1H, m, ov, H19), 1,11 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,07 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 0,94 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,91 (1H,

m, ov, H1), 0,82 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,79 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,76 (1H, m, H5), 0,62 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

<sup>13</sup>C NMR (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 140,3 (C13), 128,1 - 127,5 (-CH<sub>2</sub>-Ph), 121,9 (C12), 98,1 (C31), 78,5 (C3), 75,6 (C21), 72,7 (C22), 72,3 (-CH<sub>2</sub>-Ph), 70,9 (C28), 68,3 (C16), 63,0 (C24), 55,6 (C5), 47,0 (C7), 44,5 (C19), 42,9 (C17), 41,0 (C18), 40,9 (C14), 39,2 (C8), 38,1 (C1), 36,4 (C6), 35,4 (C20), 34,9 (C15), 32,5 (C9), 30,3 (-CH<sub>3</sub> C29 oraz C32), 28,0 (-CH<sub>3</sub> C27), 27,2 (C2), 23,8 (-CH<sub>3</sub> C33), 22,8 (C23), 22,7 (C11), 18,5 (C10), 18,1 (-CH<sub>3</sub> C30), 17,9 (-CH<sub>3</sub> C26), 15,7 (-CH<sub>3</sub> C25).

#### 4.12 24,28-dibenzylo-16,22-O,O-izopropylidenoproteoscygenina

28-benzylo-16,22-O,O-izopropylidenoproteoscygeninę (**10**, 0,52 g, 0,82 mmola) oraz bromek tetrabutylamonowy (0,13 g, 0,41 mmola) rozpuszczono w THF (40 mL). Następnie dodano 33% roztwór KOH (5 g KOH/10 mL wody), dodano bromek benzylu (0,21 g, 146 μL, 1,23 mmola) i mieszano intensywnie w RT. Postęp reakcji kontrolowano TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 6:4; R<sub>f</sub> produktu = 0,69 (R<sub>f</sub> bardzo zbliżone do 28-benzylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny)) – substrat nie uległ wyczerpaniu po 1,5 godziny. Dodano reagentów: 6 eq bromku benzylu i 1 eq bromku tetrabutylamonowego oraz mieszano przez 16 godzin doprowadzając do wyczerpania substratu.

Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza, następnie dodano wodę (70 mL). Ekstrahowano CHCl<sub>3</sub> (2 × 40 mL). Fazę organiczną zatężono maksymalnie otrzymując surowy produkt w postaci żółtego oleju.

Produkt oczyszczano chromatograficznie (25 g żelu krzemionkowego, eluent: CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 95:5). Plama potencjalnego produktu okazuje się mieszaniną przynajmniej dwóch związków o bardzo zbliżonej polarności – rozdział okazał się niemożliwy.

#### 4.13 24-allilo-28-benzylo-16,22-O,O-izopropylidenoproteoscygenina

28-benzylo-16,22-O,O-izopropylidenoproteoscygeninę (**10**, 200 mg, 0,31 mmola) oraz bromek tetrabutylamonowy (100 mg, 0,31 mmola) rozpuszczono w THF (5 mL). Następnie dodano 33% roztwór KOH (2,5 g KOH/5 mL wody), dodano bromek allilu (41 μL,

0,47 mmola) i mieszano w *RT*. Postęp reakcji kontrolowano TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 6:4; R<sub>f</sub> produktu = 0,68) – substrat nie uległ wyczerpaniu po 24 godzinach, dodanie reagentów nie zmieniło stopnia przereagowania. Zmiana układu do TLC na CHCl<sub>3</sub> – widoczne 2 produkty o prawie identycznym R<sub>f</sub> (prawdopodobnie pochodna podstawiona w pozycji C3 oraz C24).

Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza, następnie dodano wodę (15 mL). Ekstrahowano chloroformem (2 × 15 mL). Fazę organiczną odparowano otrzymując 0,35 g surowego produktu w postaci pianki.

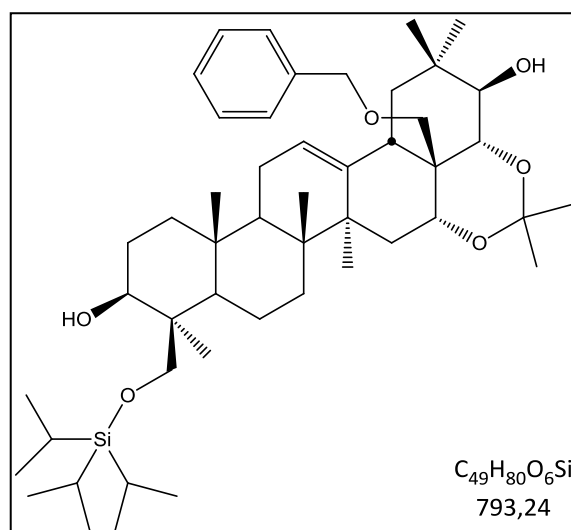
Produkt oczyszczano chromatograficznie (11 g żelu krzemionkowego, eluent: CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 98:2 → 95:5). Otrzymano frakcje 50 mg oraz 40 mg o czystości niewystarczającej do potwierdzenia struktury produktów.

#### 4.14 28-benzylo-24-(triizopropylsililo)-16,22-O,O-izopropylideno-protoscygenina (**11**)

28-benzylo-16,22-O,O-izopropylidenoprotoscygeninę (**10**, 100 mg, 0,16 mmola) oraz imidazol (19 mg, 0,27 mmola) rozpuszczono w DMF (5 mL). Następnie dodano chlorek triizopropylsililu (46 mg, 51 µL, 0,24 mmola) i mieszano w *RT*. Postęp reakcji kontrolowano TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 6:4; R<sub>f</sub> produktu = 0,77) – substrat nie uległ wyczerpaniu po 2 godzinach jak również po pozostawieniu na 20 godzin. Dodano reagentów: 1,7 eq imidazolu i 1,5 eq chlorki triizopropylsililu – substrat przereagował całkowicie.

Mieszaninę reakcyjną zatężono maksymalnie otrzymując olej, dodano następnie chloroform i octan etylu do wytrącenia osadu (nadmiar substratu siliowego oraz imidazolu), który odsączono. Przesącz zatężono maksymalnie otrzymując 183 mg surowego produktu w postaci gęstego oleju. Oczyszczano chromatograficznie (7 g żelu krzemionkowego,

eluent:



**HRMS** C<sub>49</sub>H<sub>80</sub>O<sub>6</sub>Si (ESI): 815,00 [M+Na]<sup>+</sup>

$C_{59}H_{74}O_6$   
879,22

145



H10, H15), 1,45 (4H, m, H2 oraz -CH<sub>3</sub> H23), 1,39 – 1,30 (6H, m, ov, H7, H9, H11 oraz -CH<sub>3</sub> H33), 1,29 – 1,26 (5H, m, ov, H1, H19 oraz -CH<sub>3</sub> H32), 1,06 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 0,98 (1H, m, ov, H10), 0,96 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,90 (1H, m, H2), 0,80 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,75 – 0,71 (2H, m, ov, H1 oraz H5), 0,20 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25).

<sup>13</sup>C NMR (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 139,8 (C13), 138,4 - 127,3 (-CH<sub>2</sub>-Ph), 128,4 – 127,2 (-C-Ph<sub>3</sub>), 122,5 (C12), 99,1 (C31), 87,4 (-C-Ph<sub>3</sub>), 80,3 (C3), 77,0 (C21), 74,3 (C22), 73,0 (-CH<sub>2</sub>-Ph), 70,9 (C28), 69,3 (C16), 64,9 (C24), 56,6 (C5), 47,8 (C7), 44,3 (C19), 43,8 (C17), 41,6 (C18), 41,4 (C14), 39,6 (C8), 38,5 (C1), 36,6 (C6), 35,1 (C20), 36,1 (C15), 32,5 (C9), 30,8 (-CH<sub>3</sub> C33), 29,7 (-CH<sub>3</sub> C30), 28,7 (-CH<sub>3</sub> C27), 27,5 (C2), 24,5 (-CH<sub>3</sub> C32), 23,0 (C23 oraz C11), 18,4 (C10 oraz -CH<sub>3</sub> C26), 16,7 (-CH<sub>3</sub> C29), 15,9 (-CH<sub>3</sub> C25).

#### 4.16 Glikozydowanie 28-benzylo-24-(triizopropylsililo)-16,22-O,O-izopropylidenoproteoscygeniny

28-benzylo-24-(triizopropylsililo)-16,22-O,O-izopropylidenoproteoscygeninę (**11**, 45 mg, 0,057 mmola) oraz chloroimidan tetrabenzylo-D-mannozy (50 mg, 0,068 mmola) dosuszono mieszając na wyparce próżniowej. Następnie dodano wyprażone wcześniej sproszkowane sita molekularne 4Å i zalano chlorkiem metylenu (5 mL, suchy). Mieszaninę ochłodzono do -40°C (łaznia acetonitrylu/suchy lód) po czym dodano tryflan trimetylosililu (TMSOTf, 4,2 mg, 3,4 µL, 0,019 mmola). Postęp reakcji kontrolowano TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 95:5; R<sub>f</sub> produktu 0,29) – substrat uległ wyczerpaniu po 20 minutach, dlatego dodano Et<sub>3</sub>N i zatężono maksymalnie.

Oczyszczano chromatograficznie (4 g żelu krzemionkowego, eluent: CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 98:2, dodatek Et<sub>3</sub>N). Otrzymano frakcje o czystości umożliwiającej analizę struktury – spektrometria MS i NMR wskazała na rozpad produktu – część cukrowa odłączyła się od części terpenowej.

#### 4.17 Reakcja propargilowania 28-benzylo-24-(trifenylometylo)-16,22-O,O-izopropylideno-proteoscygeniny

28-benzylo-24-(trifenylometylo)-16,22-O,O-izopropylideno-proteoscygeninę (**12**, 25 mg, 0,028 mmola) oraz bromek tetrabutylamonowy (23 mg, 0,07 mmola) rozpuszczono

w THF (2 mL). Następnie dodano 33% roztwór KOH (0,5 g KOH/1 mL wody) i mieszano w *RT*. Dodano następnie bromek propargilu (80% w toluenie, 6,5 mg, 5  $\mu$ L, 0,043 mmola), po czym mieszano dalej w *RT* (mieszanina staje się klarowna i nabiera brązowej barwy). Postęp reakcji kontrolowano TLC (układ: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 95:5) – po 2 godzinach brak postępu reakcji. Dodano drugą porcję bromku propargilu oraz TBABr i mieszano w *RT* przez dobę – brak postępu reakcji. Ogrzewanie mieszaniny przez kilka godzin nic nie zmieniło.

Analogiczna próba z użyciem wodorku sodu w temperaturze wrzenia zakończyła się podobnie negatywnym wynikiem.

#### 4.18 24,28-*O*-bis-(*tert*-butylodifenylosililo)-protoescygenina (**13**)

##### A. Metoda z oczyszczaniem chromatograficznym

Protoescygeninę (**1**, 400 mg, ok. 85%) rozpuszczono w bezwodnym DMF (3 mL) w *RT*. Następnie do klarownego roztworu dodano imidazol (70 mg, 1,03 mmola, 1,3 eq) oraz *tert*-butylodifenylochlosilan (TBDPSiCl; 250  $\mu$ L, 0,95 mmola, 1,2 eq) i mieszano przez 1 h. Następnie dodano drugą porcję imidazolu (60 mg, 0,87 mmola, 1,1 eq) oraz TBDPSiCl (226  $\mu$ L, 0,87 mmola, 1,1 eq) i mieszano przez noc w *RT*.

Dodano wodę (6 mL), wytrącony biały osad odsączono i rozpuszczono w AcOEt (10 mL), przemyto solanką (5 mL) i suszono nad MgSO<sub>4</sub>. Po odsączeniu środka suszącego otrzymany materiał oczyszczono chromatograficznie na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent heksan-AcOEt (3:1 → 2:1). Zebrane frakcje zatężono otrzymując bezbarwne (białe) szkliwo, 211 mg (HPLC 93,3%). Potwierdzono strukturę produktu **13**.

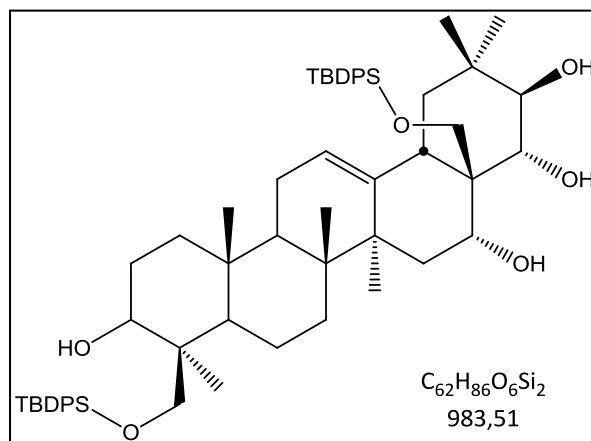
Kontrola TLC: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH (45:45:10), *R<sub>f</sub>* produktu = 0,62; heksan-AcOEt (1:1), *R<sub>f</sub>* produktu = 0,39.

<sup>1</sup>H NMR (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  [ppm]: 7,65 - 7,36 (20H, m, -SiPh<sub>2</sub>tBu), 5,26 (1H, m, H12), 4,38 (1H, d, *J* = 4,5 Hz, C3-OH), 4,29 (1H, d, *J* = 4,0 Hz, C16-OH), 4,22 (1H, d, *J* = 4,0 Hz, C21-OH), 4,02 (1H, m, H22), 3,88 (1H, m, H21), 3,83 - 3,79 (2H, m, ov, H16 oraz H24), 3,76 (1H, d, *J* = 5,6 Hz, C22-OH), 3,68 (1H, d, *J* = 10,0 Hz, H24), 3,37 (1H, m, ov, H28), 3,09 - 3,02 (2H, m, ov, H3 oraz H28), 2,75 (1H, m, H18), 2,41 (1H, m, H19), 1,77 (1H, m, H11), 1,63 (1H, m, ov, H10), 1,54 (1H, m, ov, H10), 1,51 (1H, m, ov, H1), 1,47 (1H, m, ov, H7), 1,40 (1H, m,

H2), 1,31 (4H, m, ov, H15 oraz -CH<sub>3</sub> H27), 1,11 (4H, m, ov, H15 oraz -CH<sub>3</sub> H23), 1,10 - 1,00 (2H, m, ov, H9 oraz H19), 0,94 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,90, 0,88 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,80 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,70 (1H, d, J = 11,6 Hz, H5), 0,29 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

<sup>13</sup>C NMR (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]:

142,7 (C13), 122,3 (C12), 77,2 (C3 oraz C21), 71,1 (C22), 67,0 (C16), 65,8 (C24), 63,9 (C28), 55,5 (C5), 47,2 (C17), 46,9 (C19), 46,3 (C7), 42,8 (C4), 40,6 (C14), 39,1 (C18), 38,9 (C8), 38,5 (C1), 36,4 (C6), 35,5 (C20), 33,4 (C15), 33,1 (C9), 30,0 (-CH<sub>3</sub> C29), 27,0 (C2), 26,6 (-CH<sub>3</sub> C27), 23,2 (C11), 23,1 (-CH<sub>3</sub> C23), 20,1 (C10), 18,6 (-CH<sub>3</sub> C30), 15,9 (-CH<sub>3</sub> C26), 15,0 (-CH<sub>3</sub> C25).



#### B. Metoda z DMF

Protoescygeninę (**1**, 1,0 g, 1,97 mmola, 92%) oraz imidazol (174 mg, 2,56 mmola) rozpuszczono w DMF (10 mL, bezwodny) w *RT*. Kolbę reakcyjną zaopatrzono w rurkę z chlorkiem wapnia. Do mieszaniny dodano TBDPSiCl (650 mg, 2,36 mmola) i mieszano w *RT* przez 2 godziny. Po 2 godzinach kontrola TLC wskazała na niski stopień przereagowania. Dodano TBDPSiCl (1,0 g, 3,6 mmola) oraz imidazol (270 mg, 3,9 mmola) i mieszano przez noc co doprowadziło do wyczerpania substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (10 mL, wypada gęsty osad), dodano chloroform (30 mL, osad rozpuszcza się). Rozdzielono fazy i fazę wodną ekstrahowano chloroformem (20 mL), następnie połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2 × 25 mL). Fazę organiczną suszono nad MgSO<sub>4</sub>, odsączono środek suszący i odparowano otrzymując 2,59 g surowego **13** (olej).

Surowy materiał rozpuszczono na gorąco MTBE (10 mL) i wytrącano heksanem (frakcja, 300 mL). Osad odsączono i przemyto małą ilością heksanu i suszono w SP (40°C przez 3 h). Otrzymano 1,52 g białego osadu **13** z wydajnością 81,0% , czystość HPLC 94,6%.

### C. Metoda z THF

Protoescygeninę (**1**, 10,05 g, 19,1 mmol) oraz imidazol (5,23g, 76,2 mmola, 4,0 eq) rozpuszczono w bezwodnym THF (100 mL, świeżo destylowany znad Na) w *RT*. Roztwór schłodzono od 0°C (lekko zmętniał). Do mieszaniny wkroplono roztwór TBDPSiCl (15,7 g, 14,9 mL, 57,2 mmol, 3,0 eq) w bezwodnym THF (40 mL) utrzymując temperaturę poniżej 4°C. Wkraplacz przemyto THF (30 mL). Mieszano pozwalając mieszaninę ogrzać się do *RT*. Po 1 h wypadł biały osad, w mieszaninie pozostaje jeszcze monopochodna; reakcję pozostawiono na noc. Po 15 godzinach kontrola TLC wykazała jeszcze obecność monopochodnej. Dodano TBDPSiCl (1,0 mL) i mieszano przez noc, co doprowadziło do wyczerpania związku pośredniego.

Odsączono wytrącony osad (rozpuszczalny w wodzie) i przemyto THF. Dodano wodę (200 mL), solankę NaCl (100 mL) i ekstrahowano MTBE (3 × 100 mL). Połączone fazy organiczne przemyto 5% NaHCO<sub>3</sub> aq (100 mL) i solanką (100 mL). Suszono nad MgSO<sub>4</sub>, środek suszący odsączono, zatężono i suszono w SP (40°C, noc) otrzymując 22,92 g osadu surowej **13**.

Surowy materiał rozpuszczono na gorąco MTBE (30 mL) i wkroplono heksan (frakcja, 350 mL) utrzymując wrzenie roztworu. W trakcie wkraplania zaczyna wypadać biały osad. Wrzenie utrzymywano jeszcze przez ok. 2h od zakończenia wkraplania, po czym pozostawiono do wystygnięcia do *RT*. Osad odsączono i przemyto heksanem (3 × 100 mL), suszono w SP (40°C, noc). Otrzymano 16,95 g białego osadu **13** (wydajność 81,2%) o czystości HPLC 97,4%.

#### 4.19 24,28-*O*-bis-(triizopropylosililo)-protoescygenina (**14**)

Protoescygeninę (**1**, 1,0 g, 1,97 mmola, 92%) oraz imidazol (230 mg, 3,35 mmola, 1,7 eq) rozpuszczono w DMF (10 mL, bezwodny) w *RT*. Do mieszaniny dodano chlorek triizopropylosililu (TIPSiCl, 570 mg, 634 µL, 2,96 mmola, 1,5 eq) i mieszano w *RT* przez 4 godziny, po czym dodano kolejne 1,5 eq TIPSiCl i 1,7 eq imidazolu i mieszano w *RT* przez noc. Kontrola TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-octan etylu-metanol 45:45:10, R<sub>f</sub> produktu mono- = 0,38, R<sub>f</sub> produktu di- = 0,74; heksan-octan etylu 1:1, R<sub>f</sub> produktu di- = 0,64) wskazała na obecność produktu/produktów mono- oraz produktu di-podstawionego, dlatego

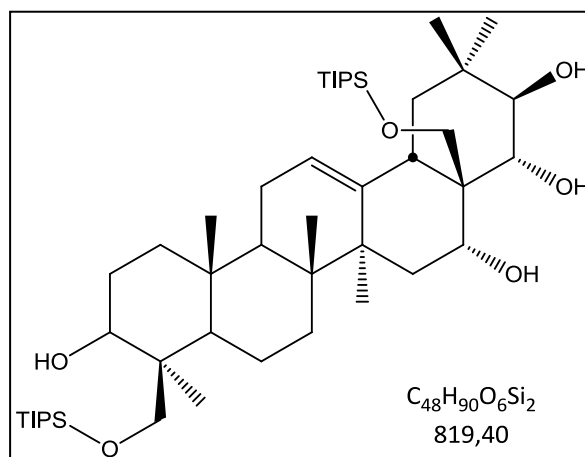
dodano kolejne 1,5 eq TIPSCl oraz 1,7 eq imidazolu i pozostawiono na kolejną dobę. Substrat zostaje prawie w całości wyczerpany, produkt/y mono- wyczerpane prawie całkowicie.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (40 mL) i ekstrahowano chlorkiem metylenu (2 x 40 mL). Fazę organiczną zatężono maksymalnie jednak nie cały DMF odparowuje się, dlatego ekstrahowano ponownie fazę organiczną w układzie woda/DMF/MTBE – typ razem po zatężeniu fazy organicznej otrzymano surowy produkt w postaci oleju, który po nocy w lodówce zamienia się w osad.

Surowy osad rozpuszczono w heksanie z którego w lodówce wypada osad. Osad odsączono i przemyto zimnym heksanem i suszono w SP (40°C przez noc) otrzymując 840 mg białego osadu **14** o czystości wystarczającej do potwierdzenia struktury.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]:

5,28 (1H, s, H12), 4,50 (1H, s, H16), 4,42 (1H, d, J = 7,8 Hz, C3-OH), 4,34 (1H, d, J = 12,0 Hz, H24), 3,81 (1H, d, J = 11,4 Hz, H22), 3,76 (1H, d, J = 11,4 Hz, H21), 3,62 (1H, d, J = 11,4 Hz, H28), 3,50 (1H, s, ov, H24), 3,49 (1H, s, ov, C22-OH), 3,32 (1H, m, ov, H28), 3,30 (1H, m, ov, H3), 2,58 (1H, s,



C21-OH), 2,34 (1H, t, J = 16,8 Hz, H19), 2,24 (1H, d, J = 4,8 Hz, C16-OH), 2,07 (1H, dd, J = 4,2 oraz 16,8 Hz, H18), 1,93 – 1,77 (4H, m, ov, H2, H11, H15, ??), 1,75 – 1,55 (5H, m, ov, H1, H2, H7, H9 oraz H10), 1,45 (1H, d, J = 16,8 Hz, H15), 1,40 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,37 (1H, m, H9), 1,29 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 1,25 (1H, m, H10), 1,16 - 1,03 (43H, m, ov, -Si-CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oraz H19), 1,01 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,93 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,90 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,85 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

**<sup>13</sup>C NMR** (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>); δ [ppm]: 141,8 (C13), 123,2 (C12), 80,4 (C3), 79,1 (C22), 78,9 (C21), 72,3 (C28), 67,2 (C16), 65,9 (C24), 55,7 (C5), 47,6 (C19), 46,8 (C7), 46,6 (C17), 42,6 (C4), 41,5 (C14), 41,2 (C18), 39,7 (C8), 38,5 (C1), 36,1 (C6), 35,1 (C20), 33,2 (C9), 32,5 (C15), 29,4 (-CH<sub>3</sub> C29), 28,0 (C2), 26,5 (-CH<sub>3</sub> C27), 23,6 (C11), 22,7 (-CH<sub>3</sub> C23), 18,5 (C10 oraz -CH<sub>3</sub> C30), 17,9 (-Si-CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 17,0 (-CH<sub>3</sub> C26), 16,5 (-CH<sub>3</sub> C25), 11,7 (-Si-CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

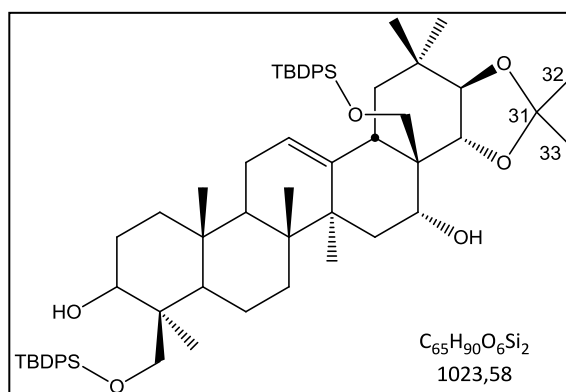
#### 4.20 24,28-O-bis-(tert-butyldifenylsililo)-21,22-O,O-izopropylidenoproteoescygenina (**15**)

24,28-O-bis-(tert-butyldifenylsililo)-proteoescygeninę (**13**, 6,0 g, 6,10 mmola), rozpuszczono w acetonie (100 mL) oraz 2,2-DMP (20 mL), mieszano w *RT* (klarowna bezbarwna mieszanina). Dodano pTSA (60 mg) i mieszano w *RT* przez 30 minut. Kontrola TLC (układ heksan-AcOEt 3:1,  $R_f$  produktu = 0,70; układ heksan-AcOEt 6:1,  $R_f$  produktu = 0,32) wskazuje na przereagowanie całości substratu i powstanie jednego głównego produktu.

Do mieszaniny dodano 5% węglan potasu (100 mL) i ekstrahowano chloroformem (2 × 100 mL). Połączone fazy organiczne suszono nad bezwodnym siarczanem sodu, następnie odsączono środek suszący i zateżono otrzymując 6,77 g osadu surowego **15** (pianka) o czystości 87,00%. Suszono w suszarce próżniowej w 40°C przez noc.

$^1\text{H}$  NMR (600 Hz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  [ppm]:

7,60 - 7,40 (20H, m, -SiPh<sub>2</sub>tBu), 5,30 (1H, m, H12), 4,60 (1H, d,  $J$  = 3,6 Hz, C16-OH), 4,55 (1H, d,  $J$  = 10,2 Hz, H21), 4,37 (1H, d,  $J$  = 4,8 Hz, C3-OH), 4,10 (1H, d,  $J$  = 10,2 Hz, H22), 3,88 (1H, bs, H16), 3,79 (1H, d,  $J$  = 10,2 Hz, H24), 3,66 (1H, d,  $J$  = 10,2 Hz, H24), 3,27 (1H,



d,  $J$  = 9,6 Hz, H28), 3,19 (1H, d,  $J$  = 9,0 Hz, H28), 3,06 (1H, m, H3), 2,62 (1H, m, H18), 2,23 (1H, m, H19), 1,80 (1H, m, H11), 1,63 - 1,49 (4H, m, ov, H1, H7 oraz 2x H10), 1,40 - 1,30 (12H, m, ov, H2, H15, H19, -CH<sub>3</sub> H27, -CH<sub>3</sub> H32 oraz -CH<sub>3</sub> H33), 1,11 (4H, m, ov, H15 oraz -CH<sub>3</sub> H23), 1,10 (1H, m, ov, H9), 0,99 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 0,94 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30), 0,79 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 0,70 (1H, m, H5), 0,37 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

$^{13}\text{C}$  NMR (150 Hz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  [ppm]: 141,1 (C13), 123,5 (C12), 107,1 (C31), 80,6 (C21), 77,2 (C3), 75,2 (C22), 67,2 (C16), 65,8 (C24), 64,4 (C28), 55,4 (C5), 44,5 (C17), 47,8 (C19), 46,1 (C7), 42,8 (C4), 41,1 (C14), 39,5 (C18), 39,1 (C8), 38,4 (C1), 36,4 (C6), 33,7 (C20), 33,7 (C15), 33,2 (C9), 29,8 (-CH<sub>3</sub> C29), 27,4 oraz 27,1 (C32 oraz C33) 26,9 (C2), 26,8 (-CH<sub>3</sub> C27), 23,2 (C11), 23,1 (-CH<sub>3</sub> C23), 20,1 (C10), 17,2 (-CH<sub>3</sub> C30), 15,9 (-CH<sub>3</sub> C26), 15,0 (-CH<sub>3</sub> C25).

#### 4.21 24,28-O-bis-(triizopropylsililo)-21,22-O,O-izopropylideno-*protoescygenina* (**16**)

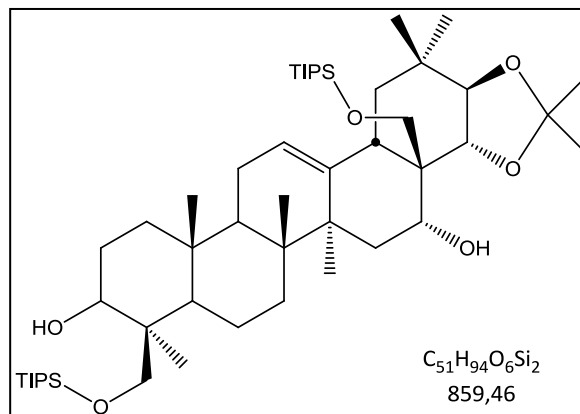
24,28-O-bis-(triizopropylsililo)-*protoescygeninę* (**14**, 450 mg, 0,55 mmola), rozpuszczono w acetonie (45 mL) oraz 2,2-DMP (8 mL), mieszano w *RT* (klarowna bezbarwna mieszanina). Dodano pTSA (5 mg) i mieszano w *RT* przez 1 godzinę. Kontrola TLC (układ heksan-AcOEt 4:1,  $R_f$  produktu = 0,49) wskazuje na przereagowanie całości substratu i powstanie jednego głównego produktu.

Do mieszaniny dodano niewielką ilość Et<sub>3</sub>N (zobojętnienie pTSA, w przeciwnym wypadku produktu rozkłada się podczas zatężania) i mieszano przez 5 minut po czym mieszaninę zatężono otrzymując 670 mg białego osadu surowego produktu.

Osad rozpuszczono w heksanie (10 mL) w podwyższonej temperaturze i odstawiono do ostygnięcia (wypada osad), a następnie umieszczono w lodówce na 30 minut. Osad odsączono i przemyto zimnym heksanem (2 mL) otrzymując 188 mg białego osadu produktu, którego czystość umożliwiła potwierdzenie struktury 24,28-O-bis-(triizopropylsililo)-21,22-O,O-izopropylideno-*protoescygeniny* (**16**).

<sup>1</sup>H NMR (600 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  [ppm]:

5,37 (1H, bs, H12), 4,42 (1H, d,  $J$  = 7,8 Hz, C3-OH), 4,34 (1H, d,  $J$  = 12,0 Hz, H24), 4,08 (2H, m, ov, H21 oraz H22), 3,96 (1H, m, H16), 3,50 (1H, d,  $J$  = 6,0 Hz, H24), 3,41 (1H, d,  $J$  = 5,4 Hz, H28), 3,30 (2H, m, ov, H3 oraz H28), 2,64 (1H, dd,  $J$  = 3,0 oraz 8,4 Hz, H18), 2,40 (1H, d,  $J$  = 4,8 Hz, C16-OH), 2,07 (1H, t,



$J$  = 8,4 Hz, H19), 1,90 (1H, m, H11), 1,85 - 1,75 (3H, m, ov, H2, H11 oraz H15), 1,74 - 1,50 (5H, m, ov, H1, H2, H7, H9 oraz H10), 1,43 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H32 lub H33), 1,40 - 1,35 (8H, m, ov, H9, -CH<sub>3</sub> H27, H15 oraz -CH<sub>3</sub> H32 lub H33), 1,28 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H23), 1,24 (1H, m, H10), 1,15 - 1,02 (45H, m, ov, -Si-CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> oraz -CH<sub>3</sub> H29), 0,98 (4H, m, ov, H1 oraz -CH<sub>3</sub> H30), 0,91 - 0,88 (4H, m, ov, -CH<sub>3</sub> H25 oraz H5), 0,85 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

<sup>13</sup>C NMR (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  [ppm]: 140,4 (C13), 124,4 (C12), 108,2 (C31), 82,9 (C21), 80,4 (C3), 75,6 (C22), 70,1 (C16), 65,9 (C24), 64,8 (C28), 55,8 (C5), 48,4 (C19), 47,0 (C7),

45,4 (C17), 42,6 (C4), 41,6 (C14), 39,8 (C8), 39,3 (C18), 38,5 (C1), 36,8 (C6), 34,2 (C15), 34,0 (C20), 33,3 (C9), 29,5 (C29), 28,1 (C2), 27,4 (-CH<sub>3</sub> C32 lub C33), 27,1 (-CH<sub>3</sub> C27), 26,9 (-CH<sub>3</sub> C32 lub C33), 23,7 (C11), 22,7 (-CH<sub>3</sub> C23), 18,5 (C10), 18,0 (-Si-CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 17,2 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,0 (C30), 16,6 (-CH<sub>3</sub> C25), 12,0 (-Si-CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 4.22 24,28-bis-(tert-butylodifenylosililo)-3-propargilo-21,22-O,O-izopropylidenoproteoscygenina

24,28-O-bis-(tert-butylodifenylosililo)-21,22-O,O-izopropylideno-proteoscygeninę (**15**, 250 mg, 0,24 mmola, 85,56%) oraz *tert*-butanolan potasu (95%, 142 mg, 1,2 mmola), rozpuszczono w THF (30 mL) i ogrzewano we wrzeniu przez 4,5 godziny. Następnie dodano bromek propargilu (80%, 80 mg, 0,54 mmola) i ogrzewano we wrzeniu 24 godziny. Kontrola TLC (układ: heksan-AcOEt 3:1) wskazuje na brak produktu. Dodano *t*BuOK (142 mg) oraz bromek propargilu (100 mg), ogrzewano kolejne 3 godziny. TLC (heksan-AcOEt 3:1), substrat wyczerpany, jeden produkt (układ heksan-AcOEt 3:1, R<sub>f</sub> = 0,21; układ CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 4:1, R<sub>f</sub> = 0,47).

Do mieszaniny dodano wodę (50 mL) i ekstrahowano chloroformem (3 × 50 mL), połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2 × 50 mL). Fazę organiczną suszono nad bezwodny siarczanem sodu, odsączono środek suszący i odparowano otrzymując 223 mg gęstego oleju.

Oczyszczano chromatograficznie (10 g żelu krzemionkowego; eluent: CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 6:1 → 5:1) otrzymując 112 mg frakcję o niskiej czystości (51%).

Dalsze próby zarzucono, ponieważ inne eksperymenty wykazały niestabilność eterów silylowych.

#### 4.23 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-metylosulfonyloproteoscygenina

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola) rozpuszczono w pirydynie (6 mL) w *RT*. Mieszaninę ochłodzono do ok. 0°C i wkroplono chlorek kwasu metylosulfonowego (chlorek mesylu, 30 mg, 0,27 mmola), mieszanina nabiera barwy jasnoróżowej. Mieszano w *RT* przez 2 godziny. Kontrola TLC (układ: heksan-AcOEt 1:1) wskazuje na obecność nieprzereagowanego substratu oraz produkt (plamki blisko siebie,



R<sub>f</sub> ulega zwiększeniu przez obecność pirydyny). Mieszano przez noc, stopień przereagowania nie uległ zmianie. Dodano chlorku mesylu (40 mg) (wg TLC stopień przereagowania rośnie), dodawano kolejne porcje chlorku mesylu (130 mg, 100 mg, 50 mg i 70 mg), następnie ogrzewano mieszaninę do 40-50°C. Substrat nie został wyczerpany (z powodu obecności pirydyny trudna analiza TLC).

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (40 mL) i przeniesiono do rozdzielacza, ekstrahowano CHCl<sub>3</sub> (3 × 20 mL), fazę organiczną przemyto 5% wodorowęglanem sodu (3 × 25 mL). Połączone fazy organiczne suszono nad bezwodnym siarczanem sodu, odsączono środek suszący i odparowano otrzymując 166 mg surowego produktu (gęsty olej).

Rozdzielano chromatograficznie (10 g żelu krzemionkowego; eluent: heksan-AcOEt-CHCl<sub>3</sub> 6:3:1 → 5:4:1 → 4.5:4.5:1). Otrzymane frakcje bardzo zanieczyszczone (HPLC ok. 50%), potwierdzenie struktury było niemożliwe.

#### 4.24 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-paratoluenosulfonyloprotoescygenina

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola) rozpuszczono w pirydynie (5 mL) w RT. Następnie dodano chlorek kwasu para-toluenosulfonowego (chlorek tosyłu, 55 mg, 0,29 mmola) i mieszano w RT przez 30 minut. Kontrola TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH 45:45:10) wskazuje na brak postępu reakcji. Ogrzewano mieszaninę w 40°C przez 1 godzinę, następnie z braku postępu kolejną godzinę w 60°C. Dodano jeszcze dwukrotnie chlorku tosyłu (32 mg) oraz 4-DMAP w ilości katalitycznej, jednak nie zaobserwowano postępu reakcji.

#### 4.25 28-halogeno-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygenina

A. Reakcja Appel'a (zamiana -OH na -Br)

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola, 89,77%), tetrabromek węgla (63 mg, 0,19 mmola) zawieszono w chlorku metylenu (10 mL) i ochłodzono do ok. 0°C, po czym dodawano porcjami trifenylofosfinę (50 mg, 0,19 mmola)

i mieszano dalej w *RT*. Kontrola TLC (układ:  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 85:15) wskazuje na brak postępu reakcji. Pozostawienie na dłuższy czas nie zmienia stopnia przereagowania.

Analogiczna reakcja w suchym THF daje również wynik negatywny.

#### B. Reakcja Appel'a (zamiana -OH na -I)

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 50 mg, 0,09 mmola, 89,77%) rozpuszczono w acetonitrylu lub chlorku metylenu (2 równoległe reakcje) a następnie dodano trifenylofosfinę (22 mg, 0,09 mmola) i trietyloaminę (ochrona acetalu). Następnie dodano jod (22 mg, 0,09 mmola) – mieszanina nabiera żółtej barwy, mieszano dalej w *RT*. Kontrola TLC (układ:  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 85:15;  $R_f$  produktu = 0,58) wskazuje na brak postępu reakcji w chlorku metylenu, natomiast reakcja w acetonitrylu zachodzi z wyczerpaniem substratu.

Mieszaninę reakcyjną przeekstrahowano  $\text{CHCl}_3$ , fazę organiczną suszono nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Analiza LC-MS fazy organicznej wskazuje na brak oczekiwanego produktu.

#### 4.26 28-azydo-3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygenina

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola, 89,77%), tosyłan imidazolu (58 mg, 0,26 mmola) i jodek tetrabutylamonowy (ilość katalityczna) rozpuszczono w DMF (10 mL) i dodano trietyloaminę (34 mg, 0,34 mmola) mieszając w *RT* (do rozpuszczenia substratów). Dodano azydek sodu (33 mg, 0,51 mmola) i mieszano w *RT* do jego rozpuszczenia po czym ogrzewano we wrzeniu (po osiągnięciu temp. wrzenia mieszanina nabrała żółtej barwy, po chwili brązowej). Kontrola TLC (układ:  $\text{CHCl}_3$ -*i*PrOH 95:5,  $R_f$  produktu = 0,80 – DMF utrudnia analizę), wskazuje na niepełne przereagowanie substratu.

Odparowano maksymalnie rozpuszczalnik (otrzymano gęsty brunatny olej), dodano chloroform (30 mL) i przemyto wodą (2 × 30 mL). Po ekstrakcji TLC (układ:  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt 6:1,  $R_f$  produktu = 0,66) wskazuje na obecność produktu oraz nieprzereagowanego substratu. Fazę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu, odsączono środek suszący i odparowano maksymalnie otrzymując 117 mg brązowego osadu.

Przed doczyszczaniem poddano analizie LC-MS, która wskazała na obecność jedynie śladowych ilości pożądanego produktu.

## 4.27 Reakcje utlenienia 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeniny

### 4.27.1 17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygenina

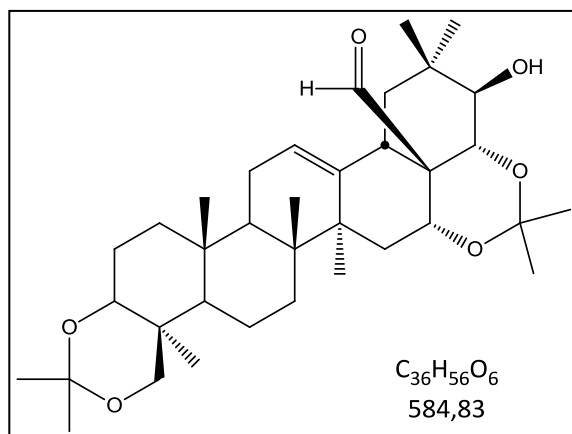
[Z użyciem 2,2,6,6-Tetrametylopiperydy-1-oxylu; TEMPO]

3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeninę (**2a**, 1 g, 1,7 mmola), bromek potasu (0,14 g, 1,2 mmola) oraz wodorosiarczan (VI) tetrabutylamoniowy (0,12 g, 1,2 mmola) zawieszono w mieszaninie chlorek metylenu (30 mL)/THF (15 mL)/woda (20 mL). Mieszaninę ochłodzono do 0-5°C, po czym dodano 2,2,6,6-Tetrametylopiperydy-1-oxyl (TEMPO, 27 mg, 0,17 mmola) - mieszanina zmienia barwę na pomarańczową, oraz podchloryn sodu (NaOCl, 14%, 0,25 g, 1,63 mL) - mieszanina zmienia barwę na żółtą. Kontrola TLC (układ: heksan-AcOEt 1:1;  $R_f$  produktu = 0,75) – substrat nie uległ wyczerpaniu po 1 godzinie, dwukrotnie dodawano reagentów: 2 × 27 mg TEMPO; 1,63 i 1 mL NaOCl i mieszano w temperaturze otoczenia przez ok. 20 godzin po czym substrat uległ wyczerpaniu.

Mieszaninę reakcyjną przeniesiono do rozdzielacza, rozdzielono fazy po czym fazę wodną ekstrahowano 2 × 10 mL chlorku metylenu. Połączone fazy organiczne suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego zatężono maksymalnie otrzymując ok. 1,5 g surowego produktu w postaci oleju.

Oczyszczano chromatograficznie (45 g żelu krzemionkowego, eluent:  $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3\text{-AcOEt } 9:1 \rightarrow 8:2 \rightarrow 9:1$ ). Otrzymano frakcję 0,70 g o czystości 94,53%.

Analiza IR potwierdza obecność grupy karbonylowej. Obecne w próbce zanieczyszczenia utrudniają analizę NMR – jednoznaczne przypisanie sygnałów nie było możliwe.



[Z użyciem kompleksu tlenku chromu (VI) z pirydyną]

3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeninę (**2a**, 0,5 g, 0,85 mmola) rozpuszczono w mieszaninie chlorku metylenu (20 mL) i THF (10 mL), następnie dodano tlenek chromu

(VI)(128 mg, 1,28 mmola) oraz pirydynę (200 mg, 206  $\mu$ L, 2,56 mmola) – mieszanina ciemnieje. Kontrola TLC (układ: heksan-AcOEt 1:1;  $R_f$  produktu = 0,75) – po 1 godzinie stopień przereagowania substratu niewielki. Mimo kolejnych porcji reagentów (w sumie 10 eq pirydyny i 5 eq tlenku chromu(VI)) stopień przereagowania bardzo niski.

#### 4.27.2 21-okso-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygenina (**17**)

[Utlenianie z użyciem odczynnika Dess-Martina]

3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeninę (**2a**, 1 g, 1,7 mmola) i wodorowęglan sodu (0,4 g, 4,8 mmola) zawieszono w chlorku metylenu (50 mL) otrzymując białą zawiesinę. Dodano odczynnik Dess-Martina (1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-one; 0,79 g, 1,9 mmola), zawiesina stała się klarowna po czym znów zmętniała. Kontrola TLC (układ:  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt 6:1;  $R_f$  produktu = 0,44) –po 1 godzinie substrat uległ wyczerpaniu niemal całkowicie.

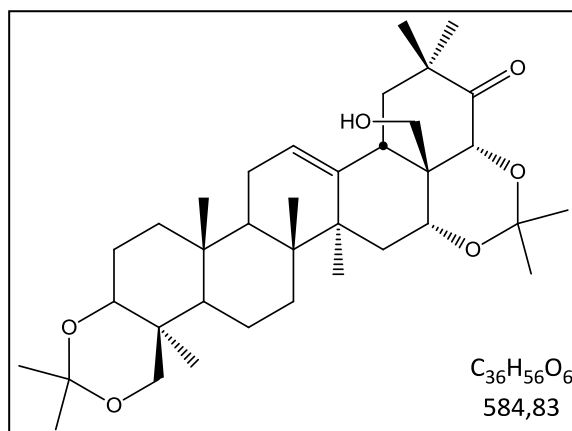
Do mieszaniny reakcyjnej dodano 10 mL wodnego nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu oraz siarczan (IV) sodu (1,4 g) i mieszano przez 30 minut. Następnie dodano 20 mL wody i przeniesiono całość do rozdzielacza, rozdzielono fazy, fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu ( $2 \times 30$  mL). Połączone fazy organiczne przemyto wodą (50 mL) i suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Odsączono środek suszący i odparowano otrzymując 1,07 g surowego produktu.

Oczyszczano chromatograficznie (30 g żelu krzemionkowego, eluent:  $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3$ -AcOEt 9:1  $\rightarrow$  8:2). Otrzymano frakcję 0,52 g produktu (**17**) o czystości 91,50%.

$^1\text{H}$  NMR (600 Hz,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  [ppm]:

5,33 (1H, t,  $J = 3,6$  Hz, H12), 5,09 (1H, t,  $J = 4,8$  Hz, C28-OH), 4,35 (1H, s, H16), 4,18 (1H, s, H22), 3,91 (1H, d,  $J = 12,0$  Hz, H24), 3,38 (1H, dd,  $J = 4,2$  oraz  $9,0$  Hz, H3), 3,14 (1H, s, H19), 3,13 (1H, d,  $J = 12,0$  Hz, H24), 3,08 (1H, dd,  $J = 5,4$  oraz  $11,4$  Hz, H28), 2,75 (1H, dd,  $J = 5,4$  oraz  $11,4$  Hz, H28), 1,96 - 1,80

(3H, m, H2, H11, H15), 1,75 (1H, d,  $J = 13,8$  Hz, H18), 1,63 (1H, m, H2), 1,55 - 1,44 (4H, m,



H1, H7, H9, H10), 1,40 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,36 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,34 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,28 (1H, m, ov, H10), 1,27 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H27), 1,26 (3H, s, -CH<sub>3</sub>), 1,25 (1H, s, H19), 1,15 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H29), 1,13 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H25), 1,12 (3H, s, H23), 1,04 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H30) 1,03 (1H, m, ov, H1), 0,87 (1H, m, H5), 0,86 (3H, s, -CH<sub>3</sub> H26).

<sup>13</sup>C NMR (150 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ [ppm]: 213,0 (C21), 141,5 (C13), 123,4 (C12), 98,2 (C34), 96,9 (C31), 76,7 (C22), 75,7 (C3), 65,2 (C16), 63,7 (C28), 62,9 (C24), 52,6 (C5), 47,1 (C19), 46,0 (C7), 44,6 (C20), 40,9 (C14), 40,7 (C18), 39,2 (C8), 37,5 (C17), 36,9 (C4), 36,1 (C1), 33,0 (C9), 29,5 (-CH<sub>3</sub>), 29,5 (C15), 28,4 (-CH<sub>3</sub> C29), 27,4 (-CH<sub>3</sub>), 24,7 (-CH<sub>3</sub> C27), 25,9 (-CH<sub>3</sub> C23), 25,4 (-CH<sub>3</sub>), 24,3 (C2), 23,7 (-CH<sub>3</sub> C30), 22,9 (C11), 19,2 (-CH<sub>3</sub>), 17,2 (-CH<sub>3</sub> C26), 17,6 (C10), 16,8 (-CH<sub>3</sub> C25).

#### 4.27.3 Inne metody utleniania

[Z użyciem KMnO<sub>4</sub>]

3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeninę (**2a**, 50 mg, 0,085 mmola) rozpuszczono w mieszaninie metanolu (5 mL) i THF (1 mL), następnie dodano mieszaninę nadmanganianu potasu (27 mg, 0,17 mmola) i Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O (30 mg, 0,17 mmola) w wodzie (5 mL) – mieszanino w RT. Kontrola TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 6:1) – nie zaobserwowano postępu reakcji.

Podobnie brak postępu reakcji w wariancie z użyciem KMnO<sub>4</sub>/NaOH/*t*BuOH.

[Z użyciem FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lub FeCl<sub>3</sub>×3H<sub>2</sub>O/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]

3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola) oraz hydrat siarczanu żelaza(II)(10 mg, 0,036 mmola) zawieszono w acetonitrylu (5 mL), następnie dodano perhydrol (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,8 mL) – zawiesina żółknie. Kontrola TLC (układ: CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 6:1) – 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoscygenina ulega rozpadowi w warunkach reakcji.

#### 4.28 Reduktywne aminowanie 17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny

17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeninę (25 mg, 0,043 mmola) oraz 1-pentyloaminę (5 mg, 6  $\mu$ L, 0,052 mmola) rozpuszczono w THF (5 mL) i mieszano w temperaturze otoczenia, po godzinie dodano  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (15 mg, 0,069 mmola). Kontrola TLC (układ:  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt 6:1) – brak postępu reakcji.

Analogiczna reakcja z użyciem aniliny (5 mg, 5  $\mu$ L) dała podobnie negatywny wynik.

#### 4.29 Reakcja Wittiga 17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny z amidem sodowym bromku izopropylfenylofosfoniowego

17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeninę (37 mg, 0,062 mmola) oraz amid sodowy bromku izopropylfenylofosfoniowego (23 mg, 0,052 mmola) rozpuszczono w THF (5 mL) z dodatkiem chloroformu (1 mL) i mieszano w temperaturze otoczenia przez 20 godzin. Kontrola TLC (układ:  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt 6:1) – brak postępu reakcji. Dodanie eteru koronowego (18-korona-6) nie zmieniło stopnia przereagowania.

#### 4.30 Reakcja 17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny z semikarbazydem

17-formylo-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeninę (100 mg, 0,17 mmola), chlorowodorek semikarbazydu (19 mg, 0,17 mmola) oraz octan sodu (28 mg, 0,34 mmola) rozpuszczono w metanolu (10 mL) z dodatkiem wody (0,5 mL) i mieszano w 50°C przez 3 godziny. Kontrola TLC (układ: heksan-AcOEt 1:1) – brak postępu reakcji. Kilkukrotne dodanie reagentów spowodowało rozpad substratu (HCl spowodował zdjęcie grup izopropylidenowych).

#### 4.31 Eter 2-chloroetoksyetylowy 3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeniny

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola, 89,77%) i wodorosiarczan(VI) tetrabutylamonowy (TBAHSO<sub>4</sub>, 289 mg, 0,85 mmola) rozpuszczono w eterze bis-2-chloroetylowym (5 mL, 0,043 mola) w RT. Dodano 50% roztwór KOH (1 mL + 0,5 mL wody na przepłukanie naczynka) i THF (5 mL). Ogrzewano we wrzeniu przez 2 godziny. Kontrola TLC (układ CHCl<sub>3</sub>-iPrOH 95:5; R<sub>f</sub> produktu = 0,70) wskazuje na wyczerpanie substratu.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (15 mL) i ekstrahowano chloroformem (2 × 10 mL), połączone fazy organiczne przemyto 5% wodorowęglanem potasu (15 mL) i suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Odsączono środek suszący i odparowywano rozpuszczalnik, jednak odparowanie eteru bis-(2-chloroetylowego) okazało się niemożliwe. Większość rozpuszczalnika oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem (ok. 10 mbar, temp. łaźni 105°C) - TLC wskazuje na zanik plamki produktu, w świetle lampy UV widoczne dwie nowe plamki (podczas destylacji następuje rozpad produktu).

#### 4.32 Reakcja Mitsunobu 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny

[Reakcja z ftalimidem]

3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 50 mg, 0,085 mmola) rozpuszczono w THF (bezwodny, 5 mL) w atmosferze gazu obojętnego. Dodano ftalimid (16 mg, 0,11 mmola), trifenylofosfinę (29 mg, 0,11 mmola) oraz eter dietylowy kwasu diazodikarboksylowego (DEAD, 19 mg, 0,11 mmola) i mieszano w RT przez 20 godzin. Kontrola TLC (układ: heksan-AcOEt 1:1) – brak postępu reakcji.

[Reakcja z N-hydroksyftalimidem]

Analogiczna do powyższej reakcja z N-hydroksyftalimidem oraz z użyciem estru diizopropylowego kwasu azodikarboksylowego (DIAD) – brak postępu reakcji.

[Reakcja z p-bromofenolem]

Analogiczna do powyższej reakcja z para-bromofenolem i DIAD – brak postępu reakcji.

#### 4.33 *28-(etyloftalimido)-3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygenina*

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola, 99,85%) rozpuszczono w THF (10 mL, suszony znad sodu), dodano wodorek sodu (60%, 12 mg, 0,51 mmola) i ogrzewano do wrzenia. Następnie dodano *N*-(2-bromoetylo)ftalimid (26 mg, 0,10 mmola) i ogrzewano dalej we wrzeniu. Postęp reakcji kontrolowano TLC (układ heksan-AcOEt 1:1) dwukrotnie w ciągu godziny, stopień przereagowania na bardzo niskim poziomie. Dodano *N*-(2-bromoetylo)ftalimid (26 mg) a po godzinie wodorek sodu (12 mg). Następnego dnia dodano *N*-(2-bromoetylo)ftalimid (60 mg) i ogrzewano ponownie we wrzeniu. Stopień przereagowania nie uległ zmianie.

#### 4.34 *3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-(propyloftalimido)-proteoscygenina*

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 100 mg, 0,17 mmola, 99,85%) rozpuszczono w THF (10 mL, suszony znad sodu). Dodano wodorek sodu (60%, 12 mg, 0,51 mmola) i ogrzewano do wrzenia, następnie dodano *N*-(3-bromopropylo)ftalimid (28 mg, 0,10 mmola) i ogrzewano dalej. Postęp reakcji kontrolowano TLC (układ heksan-AcOEt 1:1) dwukrotnie w ciągu godziny, stopień przereagowania na bardzo niskim poziomie. Dodano *N*-(3-bromopropylo)ftalimid (28 mg) a po godzinie wodorek sodu (12 mg). Następnego dnia dodano *N*-(3-bromopropylo)ftalimid (60 mg) i ogrzewano ponownie we wrzeniu. Stopień przereagowania nie uległ zmianie.

#### 4.35 *3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-28-O-(metoksykarbonylometylo)-proteoscygenina*

3,24;16,22-O,O-diisopropylidenoproteoscygeninę (**2a**, 500 mg, 0,85 mmola, 93,40%) i wodorek sodu (60%, 101 mg, 2,55 mmola), rozpuszczono w DMF (60 mL) i ogrzewano do ok. 55°C (mieszanina barwy pomarańczowo-brązowej). Po 35 minutach ogrzewania dodano bromooctan metylu (270 mg, 1,77 mmola). Kontrola TLC (układ: heksan-AcOEt 1:1,  $R_f$  produktu = 0,54), wskazuje na częściowe przereagowanie substratu. Dodano



wodorek sodu (30 mg), bromooctan metylu (130 mg) i ogrzewano dalej we wrzeniu, stopień przereagowania nie uległ zmianie.

Do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę (60 mL) i ekstrahowano chloroformem (2 × 50 mL). Fazę organiczną przemyto 5% wodorowęglanem sodu (2 × 50 mL) i suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Odsączono środek suszący, odparowano maksymalnie (DMF nie odparował całkowicie), suszono w suszarce próżniowej (40°C, noc) otrzymując 587 mg surowego produktu (olej).

Rozdział chromatograficzny w układzie gradientowym ( $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3\text{-AcOEt } 40:10 \rightarrow 35:15 \rightarrow 30:20$ ). Otrzymano mocno zanieczyszczone frakcje (czystość nie przekroczyła 64%), analiza struktury była niemożliwa.

#### *4.36 Próby otrzymania escygeniny z protoescygeniny*

Protoescygeninę (**1**, 5 g, 9,82 mmola) rozpuszczono w EtOH (50 mL), po czym dodano chlorowódor rozpuszczony w etanolu (2,93 mmol/mL, 100 mL) i ogrzewano w temperaturze wrzenia. Podczas ogrzewania mieszanina zmienia barwę z bezbarwnej na zieloną. Kontrola TLC (układ:  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt-MeOH } 45:45:10$ ;  $R_f$  produktu = 0,29) wykazała obecność nieprzereagowanego substratu, spodziewanego produktu oraz 6-7 produktów ubocznych. Mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i wysuszono w suszarce próżniowej.

Przeprowadzono próbne oczyszczania, m.in.: maceracja MTBE, krystalizacje aceton i aceton/woda, które nie spowodowały ograniczenia ilości produktów w mieszaninie.

Zastosowano także inne metod dehydratacji protoescygeniny:  $\text{HBr/CH}_3\text{COOH}$ ;  $\text{I}_2/\text{PPh}_3/\text{imidazol}$ ;  $\text{pTSA/CH}_3\text{COOH}$ . Ponownie otrzymano negatywne wyniki ograniczenia ilości produktów ubocznych.

#### 4.37 Badania polimorfizmu protoescygeniny:

##### 4.37.1 Metoda z jednego rozpuszczalnika

Protoescygeninę (**1**, 5,25 g, czystość 77,3%) rozpuszczono w MeOH (130 mL) i pozostawiono do ochłodzenia się do temperatury otoczenia. Otrzymany osad odsączono i przemyto acetonitrylem (25 mL). Otrzymano 3,41 g **1** o czystości 95,7%.

**1** (10,1 g, połączone próbki) rozpuszczono w MeOH (300 mL) we wrzeniu, a następnie pozostawiono do ochłodzenia się do temperatury otoczenia. Po 2,5 h wypadł osad, który odsączono i przemyto MeOH (2 × 15 mL). Osad suszono (suszarka próżniowa, 40 °C, nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, noc), otrzymując 4,76 g **1** o czystości 89,9%. Uzyskany przesącz wstawiono na noc do zamrażarki (ok. -15°C). Wytrącony osad odsączono i przemyto MeOH (zimny, 15 mL), suszono (suszarka próżniowa, 40°C, nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, noc), otrzymując 1,35 g **1** o czystości 90,0%.

##### 4.37.2 Metoda z dwóch rozpuszczalników

**1** (4,5 g, czystość 91,4%), rozpuszczono w *i*PrOH (70 mL) na gorąco. Utrzymując wrzenie wkroplono cykloheksan (400 mL), odstawiono grzanie. Po ok. 30 min. zaczął się wytrącać osad. Zawiesinę pozostawiono na noc do ochłodzenia się do temperatury otoczenia. Powstały osad odsączono, przemyto mieszaniną *i*PrOH – cykloheksan (1:4) i suszono (suszarka próżniowa, 40°C, nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, noc), otrzymując biały (bezbarwny) osad 3,17g **1** o czystości 98,5% (HPLC).

**1** (34,0 g, czystość 84,5% HPLC) przekrystalizowano dwukrotnie stosując *i*PrOH i cykloheksan. Otrzymano biały (bezbarwny) osad 12,8 g **1** o czystości 99,0% (HPLC).

**1** (0,5 g, 227.136/1), rozpuszczono w *i*PrOH (7 mL) na gorąco. Utrzymując wrzenie wkroplono cykloheksan (8 mL), i odstawiono grzanie. Po ok. 30 min. zaczął się wytrącać osad. Zawiesinę pozostawiono na noc do ochłodzenia się do temperatury otoczenia. Powstały osad odsączono, przemyto cykloheksanem i suszono (suszarka próżniowa, 55°C, nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, noc), otrzymując biały (bezbarwny) osad 341 mg **1** o czystości 98,7% (HPLC).

#### *4.37.3 Wytworzenie monokryształów metodą dyfuzyjną*

**1** (25 mg, 98% HPLC) umieszczono w małej fiolce i rozpuszczono w *i*PrOH (2 mL). Otwartą fiolkę umieszczono w większej fiolce. Do większej fiolki dodano wodę (ok. 5 mL), fiolkę zakręcono i pozostawiono na miesiąc. Po miesiącu delikatnie wydobyto kryształy, przemyto delikatnie wodą i wysuszono. Otrzymane kryształy użyto do wykonania pomiarów rentgenostrukturalnych.

#### *4.37.4 Przemiana fazowa pod wpływem wysokiej temperatury*

**1** (6,85 g, 227.136/1) ogrzewano w temperaturze 110°C (suszarka próżniowa, nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) przez noc (ok. 16 h). Próbkę ostudzono, otrzymano 6,51 g osadu **1**. Pobrano próbkę i przekazano do badań polimorficznych.

### *4.38 Badania polimorfizmu 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny:*

#### *4.38.1 Otrzymywanie 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny (**2a**) do badań formy krystalicznej*

**1** (550 mg) zawieszono w mieszaninie acetonu (20 mL) oraz 2,2-dimetoksypropanu (6 mL) w temperaturze otoczenia (23-24°C), otrzymując gęstą mlecznobiałą zawiesinę. Do intensywnie mieszanej zawiesiny dodano wodzian kwasu para toluenosulfonowego (pTSA, ok. 30 mg), osad rozpuścił się w ciągu kilkunastu sekund (uzyskano bezbarwny, klarowny roztwór). Mieszano dalej intensywnie w temperaturze pokojowej przez noc w *RT*. Po nocy wytrącił się biały osad. Do zawiesiny dodano 0,25 mL trietyloaminy (w celu neutralizacji pTSA) i mieszano przez 30 minut. Osad odsączono, kolbę reakcyjną i osad przemyto lodowatym acetonem (z zamrażarki, ok. 15 mL), suszono (suszarka próżniowa, 35°C, noc). Otrzymano 438 mg białego, drobnokrystalicznego osadu **2a** z wydajnością 68,7% o czystości HPLC 99,2%.

Metoda optymalizowana:

**1** (10,0 g, 19,74 mmola, 96,2%) zawieszono w mieszaninie acetonu (50 mL, cz.d.a) oraz 2,2-dimetoksypropanu (2,2-DMP, 50 mL, 98%, Sigma-Aldrich) w temperaturze otoczenia (23-24 °C), otrzymując gęstą mlecznobiałą zawiesinę. Do intensywnie mieszanej zawiesiny dodano wodnian kwasu para toluenosulfonowego (pTSA, 65 mg, 0,34 mmola, 98,5%, Sigma-Aldrich), w ciągu kilkunastu sekund osad rozpuszcza się (bezbarwny, klarowny roztwór). Mieszano dalej intensywnie w temperaturze pokojowej. Po 2 godzinach mieszanina zaczyna wyraźnie mętnieć a po kolejnej godzinie wypada biały osad. Mieszano w RT przez noc. Do zawiesiny dodano 3 kropel (ok. 0,05 ml) trietyloaminy (cz.d.a., POCh) i mieszano przez 30 minut. Osad odsączono a kolbę przemyto acetonem z zamrażarki (5-10 mL), suszono (suszarka próżniowa, 40°C, noc). Otrzymano 10,87 g białego, drobnokrystalicznego osadu surowego **2a** z wydajnością 93,8% o czystości HPLC 97,1%, prawdopodobnie w postaci monohydratu.

#### 4.38.2 Oczyszczanie 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoproteoscygeniny

##### MACERACJA

Surowy osad **2a** (20,02 g, 94,6%) zawieszono w MTBE (400 mL, równoważnik 20 mL/g; dodatek trietyloaminy – ok. 20 kropel  $\approx$  0,32 mL) otrzymując gęstą, mlecznobiałą zawiesinę. Ogrzewano do wrzenia (20 minut) i macerowano we wrzeniu przez 1 h 20 min, po czym odstawiono ogrzewanie i odczekano do ostygnięcia. Odsączono osad otrzymując 18,41 g białego osadu **2a** z wydajnością maceracji 92,0% o czystości HPLC 99,3%.

##### KRYSTALIZACJA

Surowy osad **2a** (500 mg, czystość 95% HPLC) zawieszono w DMF (10 mL) otrzymując mlecznobiałą zawiesinę. Ogrzewano w temperaturze 80°C do czasu całkowitego rozpuszczenia substratu, po czym odstawiono ogrzewanie i odczekano do ostygnięcia. Wypadł osad, który odsączono otrzymując 294 mg białego osadu **2a** z wydajnością krystalizacji 58,8% o czystości HPLC 99,7%.

## WYTRĄCANIE

Surowy osad **2a** (500 mg, 95%) zawieszono w propan-1-olu (20 mL; równoważnik 40 mL/g dodatek trietyloaminy – 2 krople  $\approx$  0,03 mL) otrzymując mlecznobiałą zawiesinę. Ogrzewano do wrzenia i do czasu całkowitego rozpuszczenia substratu. Utrzymując temperaturę wrzenia dodano wodę (1 mL; równoważnik 2 mL/g) co spowodowało wypadnięcie osadu, następnie odstawiono ogrzewanie i odczekano do ostygnięcia. Osad odsączono otrzymując 432 mg białego osadu **2a** z wydajnością krystalizacji 86,4% o czystości HPLC 99,5%.

### 4.38.3 Otrzymywanie monokryształu 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-*protoescygeniny*

Ok. 25-30 mg **2a** (czystość 99,3%) rozpuszczano w ok. 5 mL etanolu. Osad nie rozpuścił się całkowicie i pozostał na dnie fiołki z niedokręconą zakrętką. Po 3-4 tygodniach zaobserwowano pojawienie się kryształków w postaci igieł. Kryształy delikatnie wydobyto i wysuszono. Otrzymane kryształy **2a** użyto do wykonania pomiarów rentgenostrukturalnych.

## 5. Podsumowanie wyników oraz wnioski

Podsumowanie należałoby zacząć od przypomnienia o badawczo-technicznym charakterze podjętych prac oraz potencjalnie komercyjnym wykorzystaniu wyników badań w ramach rozpoczętego w Instytucie Farmaceutycznym projektu, który legł u podstaw niniejszej Tezy doktorskiej. Praca w ramach rozbudowanego projektu badawczego wymusiła przyjęcie pewnych założeń wynikających między innymi ze strategii innowacyjności oraz tzw. systemu dobrej praktyki i zapewnienia jakości w IF. Stąd między innymi konieczność przeprowadzenia obszernej analityki polimorficznej dwóch kluczowych związków (**1** oraz **2a**).

W trakcie realizacji prowadzonych prac syntetycznych wyizolowano główną sapogeninę – protoescygeninę – pochodzącą z naturalnej mieszaniny saponin, jaką jest  $\beta$ -escyna. Innowacyjna metoda izolacji protoescygeniny opracowana w Instytucie Farmaceutycznym umożliwiła otrzymanie nawet kilogramowych szarż związku w skali technicznej, który następnie można było modyfikować zgodnie z poczynionymi założeniami.

Wykorzystując zaplanowane szlaki syntetyczne otrzymano 27 pochodnych o potwierdzonej strukturze.

Wśród uzyskanych pochodnych wyróżnić można między innymi serie związków z pierścieniem triazolowym jako łącznikiem umożliwiającym przyłączanie cząsteczek o zróżnicowanej strukturze (cukrowej, aromatycznej czy fosforoalkilowej) do elementu trójtterpenowego. Pochodne te stanowią przykład zastosowania metodologii „*Click chemistry*” do otrzymywania nawet bardzo skomplikowanych związków. Posługując się taką metodologią (i jej podobnymi) możliwe jest otrzymywanie obszernych zbiorów (bibliotek) pochodnych, w których może się znaleźć substancja aktywna biologicznie potencjalnego przyszłego leku. Zastosowana reakcja cykloaddycji katalizowanej miedzią (II) z wykorzystaniem bardzo łagodnych warunków nie wyklucza z użycia w szlaku syntetycznym nawet mało odpornych grup zabezpieczających.

Przeprowadzone próby zabezpieczenia oraz modyfikacji grup hydroksylowych protoescygeniny doprowadziły do otrzymania wielu cennych pochodnych co stanowi

istotną wartość doświadczalną. Niestety z uwagi na skomplikowaną strukturę (obecność wielu grup hydroksylowych) tylko część prób selektywnego zabezpieczania/usuwania grup zabezpieczających zakończyła się wynikiem pozytywnym. Jednakże właśnie ze względu na fakt, iż chemia polifunkcyjnych (w szczególności polihydroksylowych) terpenów nie jest mocno eksplorowana, wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych, coraz bardziej ukierunkowanych badań nad selektywną funkcjonalizacją układów tego typu.

## 6 Stosowane skróty

Ac	– grupa acetylowa
All	– grupa allilowa
AN	– acetonitryl
Ang	– kwas angelikowy
AscNa	– askorbinian sodu
ATP	– adenozy-5'-trifosforan
Bn	– grupa benzyłowa
Bu ( <i>t</i> Bu)	– grupa butylowa (grupa <i>tert</i> -butylowa)
cHex	– cykloheksan
CoA	– koenzym A
CVI	– Zespół przewlekłej niewydolności żyłnej
DMAPP	– synton izoprenowy dimetyloallilowy
DMF	– dimetyloformamid
2,2-DMP	– 2,2-dimetoksypropan
DMSO	– dimetylosulfotlenek
DSC	– skaningowa kalorymetria różnicowa (Differential Scanning Calorimetry)
Et	– grupa etylowa
FPP	– pirofosforan farnezyłu
Gal	– galaktoza
Glc	– glukoza
HCSE	– ekstrakt z nasion kasztanowca
HRMS	– spektrometria mas w wysokiej rozdzielczości (High-resolution Mass Spectrometry)
IPP	– synton izoprenowy izopentenylowy
<i>i</i> Pr	– grupa <i>izo</i> -propylowa
IR	– spektroskopia w podczerwieni (Infrared Spectroscopy)
MBn	– grupa metoksybenzyłowa
Me	– grupa metylowa
MTBE	– eter metylowo- <i>tert</i> -butylowy



NMR	– spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (Nuclear Magnetic Resonance)
ORTEP	– Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program
OSQ	– 2,3-epoksyskwalen
PG	– grupa zabezpieczająca (Protection Group)
Ph	– grupa fenyłowa
PTC	– kataliza przeniesienia fazowego (Phase-transfer Catalyst)
pTSA	– kwas <i>para</i> -toluenosulfonowy
SAR	– Structure-Activity Relationship
SEM	– skaningowa mikroskopia elektronowa
SQ	– skwalen
TBABr	– bromek tetra-butyloamoniowy
TBAF	– fluorek tetra-butyloamoniowy
TBAHSO <sub>4</sub>	– wodorosiarczan tetra-butyloamoniowy
TBAI	– jodek tetra-butyloamoniowy
TBDMS	– grupa <i>tert</i> -butylodimetylosililowa (tBuMe <sub>2</sub> Si-)
TBDPS	– grupa <i>tert</i> -butylodifenylosililowa (tBuPh <sub>2</sub> Si-)
TEA	– trietyloamina (Et <sub>3</sub> N)
TEMPO	– 2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl
TES	– grupa trietylosililowa
TGA	– analiza termogravimetryczna (Thermogravimetric Analysis)
THF	– tetrahydrofuran
TIPS	– grupa triizopropylosililowa (iPr <sub>3</sub> Si-)
Tig	– kwas tyglinowy (tyglowy)
TMSOTf	– trifluorometylosulfonian trimetylosililu
XRPD	– dyfrakcja proszkowa (X-ray Powder Diffraction)
Xyl	– ksyloza

## 7 Wykaz rycin

Rys. 1. Struktura skwalenu (SQ). .....	8
Rys. 2. Struktura OSW-1 oraz jej analogów – saponiny z roślin rodzaju <i>Ornithogalum</i> . ....	10
Rys. 3. Wynik analizy SAR dla saponiny OSW-1 w kontekście aktywności przeciwnowotworowej (Tang, Li, Duan, Tao). .....	12
Rys. 4. Struktura modyfikowanych elementów cukrowych oraz łańcucha w pozycji C17 (Tang et al.). .....	13
Rys. 5. Modyfikacje części cukrowej analogu OSW-1 (Tschamber et al.). .....	14
Rys. 6. Wzór strukturalny składników mieszaniny pochodzącej z nasion kasztanowca. ....	18
Rys. 7. Konfiguracje stereoizomerów inozytolu. ....	26
Rys. 8. Stryktura „płaska” oraz przestrzenna protoescygeniny (1). .....	30
Rys. 9. Struktury triazoli, które poddano reakcjom zdjęcia grup zabezpieczających części cukrowych. ....	45
Rys. 10. Zestawienie dyfraktogramów form polimorficznych: forma I (próbka 7), forma II (próbka 2), forma III (próbka 16), forma IV (próbka 10), forma V (próbka 16, 110°C), forma VI (próbka 6). .....	80
Rys. 11. Zestawienie widm IR form polimorficznych (od góry): forma I (próbka 7), forma II (próbka 2), forma III (próbka 16), forma IV (próbka 10), forma V (próbka 16, 110°C), forma VI (próbka 6). .....	81
Rys. 12. Zestawienie krzywych TGA próbek należących do formy I. ....	82
Rys. 13. Zestawienie krzywych DSC oraz TGA próbek należących do formy II. ....	83
Rys. 14. Zestawienie krzywych DSC oraz TGA próbek należących do formy III. ....	85
Rys. 15. Zestawienie krzywych DSC oraz TGA próbek należących do formy IV. ....	86
Rys. 16. Zestawienie krzywych DSC oraz TGA próbek należących do formy VI. ....	87
Rys. 17. Zestawienie krzywych DSC protoescygeniny – (od góry) formy II, III, IV i VI. ....	88
Rys. 18. Rysunek ORTEP formy IV protoescygeniny. ....	89
Rys. 19. Zdjęcia mikroskopowe kryształów form polimorficznych protoescygeniny. ....	90
Rys. 20. Zestawienie dyfraktogramów próbek należących do formy A. ....	92
Rys. 21. Zestawienie dyfraktogramów próbek należących do wysokotopliwej oraz niskotopliwej formy B. ....	93

Rys. 22. Porównanie dyfraktogramów próbek należących do formy A oraz formy B do symulowanego dyfraktogramu solwatu (w zakresie kątów 3,5 - 21,5°). .....	94
Rys. 23. Porównanie widm IR próbek należących (od góry) do formy B(nt), B(wt) oraz formy A. ....	95
Rys. 24. Porównanie widm Ramana próbek należących (od góry) do formy B(nt), B(wt) oraz formy A. ....	95
Rys. 25. Zestawienie krzywych DSC próbek należących do formy A. ....	96
Rys. 26. Zestawienie krzywych DSC próbek należących do formy B(wt) – 3 górne krzywe oraz B(nt) – 4 dolne krzywe. ....	97
Rys. 27. Rysunek ORTEP solwatu z etanolem. ....	98
Rys. 28. Ogląd mikroskopowy SEM kryształów form polimorficznych 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-protoescygeniny.....	100

## 8 Wykaz schematów

Schemat 1. Powstawanie syntonów izoprenowych.....	7
Schemat 2. Enzymatyczne przekształcenia skwalenu do trójterpenu – $\beta$ -amyryny.....	9
Schemat 3. Uproszczony schemat syntezy totalnej saponiny OSW-1 z 1999 roku (Deng et al.). ....	15
Schemat 4. Regioselektywność w reakcji benzylowania ortoestrów <i>mio</i> -inozytolu. ....	27
Schemat 5. Stopniowa hydroliza $\beta$ -escyny (mieszaniny saponin) do mieszaniny sapogenin a następnie izolacja oraz krystalizacja jednego aglikonu - protoescygeniny. .	36
Schemat 6. Reakcja propargilowania protoescygeniny. 2 preferowane produkty – podstawione I-rzędowe grupy hydroksylowe. ....	38
Schemat 7. Reakcja propargilowania 3,24;16,22-di-O,O-izopropylidenoprotoscygeniny (dwa wyizolowane produkty). ....	39
Schemat 8. Ogólny zapis reakcji dipolarnej 1,3-cykloaddycji Huisgena 3,24;16,22-O,O-diizopropylideno-protoscygeniny.....	40
Schemat 9. Metoda „Click Chemistry” w otrzymywaniu połączenia triazolowego między zabezpieczonym aglikonem a zabezpieczonymi azydkami. ....	41
Schemat 10. Metoda „Click Chemistry” w otrzymywaniu połączenia triazolowego między zabezpieczonym aglikonem a estrami etylowymi azydku fosforowego. ....	42
Schemat 11. Alternatywne ścieżki otrzymywania triazoli na różnym stopniu zabezpieczenia.....	43
Schemat 12. Reakcja dipolarnej 1,3-cykloaddycji Huisgena – triazole z wolnymi grupami aglikonu. ....	44
Schemat 13. Usunięcie grup zabezpieczających z aglikonu oraz części cukrowej. ....	46
Schemat 14. Wariantowa analiza retrosyntetyczna związku z wolną grupą hydroksylową C3.....	48
Schemat 15. Reakcja acetonidowania protoescygeniny (dwie wyizolowane pochodne). ..	49
Schemat 16. Wprowadzenie eteru allilowego do protoescygeniny (dwa przewidywane produkty). ....	52
Schemat 17. Reakcja zabezpieczenia pozycji C28 eterem trytylowym. ....	53
Schemat 18. Reakcja zabezpieczenia pozycji C28 eterami sililowymi (TBDMS i TBDPS). ....	54

Schemat 19. Reakcja zabezpieczenia pozycji C28 eterem benzylowym. ....	55
Schemat 20. Selektwyne usuwanie acetalu izopropylidenowych. ....	56
Schemat 21. Reakcja benzylowania pozycji C24 w warunkach PTC. ....	57
Schemat 22. Reakcja podstawienia bromkiem allilu – dwa możliwe produkty (trzeci potencjalny produkt - substytucja pozycji C21 mało prawdopodobna). ....	58
Schemat 23. Reakcja silylowania pozycji C24. ....	59
Schemat 24. Reakcja trytylowania pozycji C24. ....	60
Schemat 25. Glikozydowanie pozycji C3 z wykorzystaniem donoru Schmidta. ....	61
Schemat 26. Reakcje wprowadzenia eterów silylowych (główny produkt dipodstawiony). ....	62
Schemat 27. Reakcja zabezpieczenia pozycji C24 i C28 grupą TBDPS. ....	64
Schemat 28. Reakcja zabezpieczenia pozycji C24 i C28 grupą TIPS. ....	64
Schemat 29. Reakcja acetonidowania 24,28-bis-(tert-butyldifenylsilylo)-protoescygeniny. ....	65
Schemat 30. Reakcja acetonidowania 24,28-bis-(triizopropylsilylo)-protoescygeniny. ....	66
Schemat 31. Reakcja propargilowania 24,28-bis-(tert-butyldifenylsilylo)-21,22-O,O-izopropylideno-protoescygeniny. ....	67
Schemat 32. Reakcja Appel’a – zamiana grupy hydroksylowej na halogenek. ....	69
Schemat 33. Reakcja Appel’a wprowadzenia grupy azydkowej w wariacie z tosyłanem imidazolu. ....	69
Schemat 34. Wynik utleniania 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoescygeniny odczynnikami Dess-Martina. ....	71
Schemat 35. Reakcja z eterem bis-2-chloroetylowym jako metoda pośredniego wprowadzenia halogenku. ....	72
Schemat 36. Wykorzystanie modyfikowanych ftalimidów jako źródła grupy aminowej. ....	73
Schemat 37. Wykorzystanie bromooctanu metylu jako źródła grupy karboksylowej. ....	74
Schemat 38. Zamknięcie pierścienia w protoescygeninie prowadzące do struktury escygeniny. ....	75

## 9 Wykaz tabel

Tabela 1. Warunki otrzymywania próbek protoescygeniny.....	78
Tabela 2. Zestawienie charakterystycznych wartości pasm w widmie IR dla form protoescygeniny, [cm <sup>-1</sup> ]. .....	82
Tabela 3. Zestawienie uzyskanych danych rentgenostrukturalnych dla monokryształu formy IV.....	89
Tabela 4. Wyniki oglądu mikroskopowego protoescygeniny.....	90
Tabela 5. Warunki otrzymywania próbek 3,24;16,22-O,O-diizopropylidenoprotoescygeniny.....	91
Tabela 6. Zestawienie danych rentgenostrukturalnych dla solwatu z etanolem. ....	98

## 10 Literatura

1. Wallach O., „Terpene und Campher; Zusammenfassung eigener Untersuchungen auf dem Gebiet der alicyclischen Kohlenstoffverbindungen” **1909**.
2. Ruzicka L., *Experientia* **1953**, 9, 357-367.
3. Eschenmoser A., Ruzicka L., Jeger O., Arigoni D., *Helvetica Chimica Acta* **1955**, 38, 1890-1904.
4. Eschenmoser A., Arigoni D., *Helvetica Chimica Acta* **2005**, 88, 3011-3050.
5. Boutanaeva A.M., Mosesb T., Zic J., Nelsond D.R., Mugfordb S.T., Petersc R.J., Osbourn A., *PNAS* **2015**, 112, E81-E88.
6. Lodeiro S., Xiong Q., Wilson W.K., Kolesnikova M.D., Onak C.S., Matsuda S.P.T., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11213-11222.
7. Tantillo D.J., *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 1035-1053.
8. Tang Y., Yu B., Hu J., Wu T., Hui Y., *J. Chin. Pharm. Sci.* **2001**, 10, 169-171.
9. Ghannamy U., Kopp B., Robien W., Kubelka W., *Planta Med.* **1987**, 53, 172-178.
10. Kubo S., Mimaki Y., Terao M., Sashida Y., Nikaido T., Ohmoto T., *Phytochemistry* **1992**, 31, 3969-3973.
11. Mimaki Y., Kuroda M., Kameyama A., Sashida Y., Hirano T., Oka K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 633-636.
12. Tang Y., Li N., Duan J., Tao W., *Chem. Rev.* **2013**, 113, 5480-5514.
13. Morzycki J.W., Wojtkielewicz A., Wołczyński S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3323-3326.
14. Kuroda M., Mimaki Y., Yokasuka A., Sashida Y., Beutler J.A., *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 88-91.
15. Kuroda M., Mimaki Y., Yokasuka A., Hasegawa F., Sashida Y., *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1417-1423.
16. Zheng D., Guan Y., Chen X., Xu Y., Chen X., Lei P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 3257-3260.
17. Shi B., Tang P., Hu X., Liu J.O., Yu B., *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 10354-10367.

18. Tang P., Mamdani F., Hu X., Liu J.O., Yu B., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 1003-1007.
19. Shi B., Wu, H.; Yu B., Wu J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4324-4327.
20. Tschamber T., Adam S., Matsuya Y., Masuda S., Ohsawa N., Maruyama S., Kamoshita K., Nemoto H., Eustache J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5101-5106.
21. Deng S., Yu B., Lou Y., Hui Y., *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 202-208.
22. Xue J., Liu P., Pan Y., Guo Z., *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 157-161.
23. Xu Q., Peng X., Tian W., *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 9375-9377.
24. Tschesche R., Axen U., Snatzke G., *Liebigs Ann. Chem.* **1963**, 669, 171-182.
25. Wulff G., Tschesche R., *Tetrahedron* **1969**, 25, 415-436.
26. Kuhn R., Löw I., *Liebigs Ann. Chem.* **1963**, 669, 183-188.
27. Sirtori C.R., *Pharmacological Research* 2001, 44, 183-193.
28. Arnould T., Janssens D., Michiels C., Remacle J., *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, 315, 227-233.
29. Bazzoni G., Dejana E., Del Maschio A., *Haematologica* **1991**, 76, 491-499.
30. Bisler H., Pfeifer R., Klueken N., Pauschinger P., *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1986**, 111, 1321-1329.
31. Facino R.M., Carini M., Stefani R., Aldini G., Saibene L., *Archiv der Pharmazie* **1995**, 328, 720-724.
32. Guillaume M., Padioleau V., *Arzneim-Forsch* **1994**, 44, 25-35.
33. Bombardelli E., Morazzoni P., Griffini A., *Fitoterapia* **1996**, 67, 483-511.
34. Matsuda H., Li Y., Yoshikawa M., *Life Sciences* **2000**, 66, 2233-2238.
35. Annoni F., Mauri A., Marincola F., Resele R.F., *Arzneim-Forsch* **1979**, 29, 672-677.
36. Longiave D., Omini C., Nicosia S., Berti F., *Pharmacol. Res. Commun.* **1978**, 10, 145-152.
37. Pittler M.H., Ernst E., *Arch. Dermatol.* **1998**, 134, 1356-1360.
38. Bielanski T.E., Piotrowski Z.H., *J. Fam. Pract.* **1999**, 48, 171-172.
39. Pirard J., Gillet P., Guffens J.M., Defrance P., *Rev. Med. Liege* **1976**, 31, 343-345.
40. Sculimbrene B.R., Miller S.J., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10125-10126.



41. Sculimbrene B.R., Morgan A.J., Miller S.J., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11653-11656.
42. Sureshan K.M., Shashidhar M.S., Pravin T., Das T., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4477-4504.
43. Sureshan K.M., Murakami T., Watanabe Y., *Synlett* **2005**, 26, 769-772.
44. Wang C.-C., Lee J.-C., Luo S.-Y., Kulkarni S.S., Huang Y.-W., Lee C.-C., Chang K.-L., Hung S.-C., *Nature* **2007**, 446, 896-899.
45. Thomas J.R., Dwek R.A., Rademacher T.W., *Biochemistry* **1990**, 29, 5413-5422.
46. Tse B., Kishi Y., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7892-7893.
47. Gauthier D.R., Bender S.L., *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 13-16.
48. Chida N., Ogawa S., *Chem. Commun.* **1997**, 807-813.
49. Bruzik K.S. (Ed.), „Phosphoinositides: Chemistry, Biochemistry and Biomedical Applications”, ACS Symposium Series 718, Am. Chem. Soc.: Washington, DC, USA, **1999**.
50. Suzuki T., Suzuki S.T., Yamada I., Koashi Y., Yamada K., Chida N., *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2874-2880.
51. Sato K-i., Akai S., Sugita N., Ohsawa T., Kogure T., Shoji H., Yoshimura J., *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7496-7504.
52. Ramana C.V., Srinivas B., Puranik V.G., Gurjar M.K., *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 8216-8219.
53. Li M., Wu A., Zhou P., *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3707-3710.
54. Collins P., Ferrier R., „In Monosaccharides: their Chemistry and their Roles in Natural Products”, John Wiley and Sons Ltd: England, **1995**.
55. Eliel E.L., Wilen S.H., Mander L.N., „In Stereochemistry of Organic Compounds”, John Wiley and Sons, **2003**.
56. Douglas N.L., Ley S.V., Osborn H.M.I., Owen D.R., Priepke H.W.M., Warriner S.L., *Synlett* **1996**, 1996, 793-795.
57. Montchamp J.-L., Tian F., Hart M.E., Frost J.W., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3897-3899.
58. Grice P., Ley S.V., Pietruszka J., Priepka H.M.W., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 197-200.
59. Berens U., Leckel D., Oepen S.C., *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 8204-8208.

60. Garegg P.J., Berg B.L., Kvarnström I., Svensson S.C.T., *Carbohydr. Res.* **1988**, 173, 205-216.
61. Yeh S.-M., Lee G.H., Wang Y., Luh T.-Y., *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8315-8318.
62. Schlueter U., Lu J., Fraser-Reid B., *Org. Lett.* **2003**, 5, 255-257.
63. Ohta T., Micjibata T., Yamada K., Omori R., Furukawa I., *Chem. Commun.* **2003**, 1192-1193.
64. Godage H.Y., Riley A.M., Woodman T.J., Potter B.V.L., *Chem. Commun.* **2006**, 2989-2991.
65. Riley A.M., Godage H.Y., Mahon M.F., Potter B.V.L., *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 171-174.
66. Purushothamachary K., Santosh Laxmi Y.R., Iyengar D.S., *Synth. Commun.* **1999**, 29, 1257-1261.
67. Suzuki K., Nonaka H., Yamaura M., *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1975-1977.
68. Tanaka N., Ogawa I., Yoshigase S., Nokami J., *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 2675-2679.
69. Legler G., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, 48, 319-384.
70. Billington D.C., „The Inositol Phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance”, VCH: New York, NY, **1993**.
71. Apiyo D., Zhao L., Tsai M.-D., Selby T.L., *Biochemistry* **2005**, 44, 9980-9989.
72. Herrera-Salgado Y., Garduno-Ramirez M.L., Vazquez L., Rios M.Y., Alvarez L., *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1031-1036.
73. Ogawa S., Kanto M., *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 493-497.
74. Wang Y.K., Chen W., Blair D., Pu M., Xu Y., Miller S., Redfield A.G., Chiles T.C., Roberts M.F., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7746-7755.
75. Devaraj S., Jagdhane R.C., Shashidhar M.S., *Carbohydr. Res.* **2009**, 344, 1159-1166.
76. Miljkovic M., „Carbohydrates: Synthesis, Mechanisms and Stereoelectronic Effects”, Springer, **2009**.
77. Sugihara J.M., *Adv. Carbohydr. Chem.* **1953**, 8, 1-44.
78. Haines A.H., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1976**, 33, 11-109.
79. Jatczak K., Gryniewicz G., *Acta biochimica Polonica* **2014**, 61, 227-243.
80. Szakiel A., Ruszkowski D., Janiszowska W., *Phytochemistry Reviews* **2005**, 4, 151-158.

81. Kujawa-Warchala K., Nazaruk J., *Borgis – Postępy Fitoterapii* **2012**, 35-47.
82. Kociński P., „Protecting Groups”, Thieme, **2003**.
83. Greene T.W., Wuts P.G.M., „Greene’s Protective Groups In Organic Synthesis”, John Wiley & Sons Inc., **2007**.
84. Park H.G., Do J.H., Chang H.N., *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2003**, 8, 1-8.
85. Ghanem A., Aboul-Enein H.Y., *Chirality* **2005**, 17, 1-15.
86. Gotor-Fernandez V., Brieva R., Gotor V., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2006**, 40, 111-120.
87. MacManus D.A., Vulfson E.N., *Enzyme and Microbial Technology* **1997**, 20, 225-228.
88. Dinda B., Debnath S., Mohanta B.C., Harigaya Y., *Chem. Biodivers.* **2010**, 7, 2327-2579.
89. Jäger S., Trojan H., Kopp T., Laszczyk M.N., Scheffler A., *Molecules* **2009**, 14, 2016-2031.
90. Newman D.J., Cragg G.M., *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 311-335.
91. Beutler J.A., *Current Protocols in Pharmacology* **2009**, 46, 9.11.1-9.11.21.
92. Sporn M.B., Liby K.T., Yore M.M., Fu L., Lopchuk J.M., Gribble G.W., *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 537-545.
93. Sheng H., Sun H., *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 543-593.
94. Kuhn R., Löw I., *Tetrahedron* **1966**, 22, 1899-1906.
95. Wulff G., Tschesche R., *Tetrahedron* **1969**, 25, 415-436.
96. Agrawal P.K., Thakur R.S., Shoolery J.N., *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1394-1396.
97. Gruza M.M., Zegrocka-Stendel O., Giller T., Gryniewicz G., Łaszcz M., Jatczak K. „Preparation of protoescigenin from escin”, PCT/PL2012/000102, **2012**.
98. Wagner J., Hoffmann H., Löw I., *Liebigs Ann. Chem.* **1969**, 729, 205-212.
99. Gruza M.M., Jatczak K., Łaszcz M., Gryniewicz G., Giller T., Witkowska A., „Sposób wytwarzania 3,24,16,22-O,O,O,O-diizopropylideno-protoescygeniny oraz jej postaci krystaliczne”, PL/P-402306, **2012**.

100. Gruza M.M., Jatczak K., Zagrodzki B., Łaszcz M., Koziak K., Malińska M., Cmoch P., Giller T., Zegrocka-Stendel O., Woźniak K., Gryniewicz G., *Molecules* **2013**, 18, 4389-4402.
101. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, 2004-2021.
102. Evans R.A., *Aust. J. Chem.* **2007**, 60, 384-395.
103. Hein C.D., Liu X.-M., Wang D., *Pharmaceutical Research* **2008**, 25, 2216-2230.
104. Gil M.V., Arévalo M.J., López Ó., *Synthesis* **2007**, 2007, 1589-1620.
105. Meldal M., Tornøe, C.W., *Chemical Reviews* **2008**, 108, 2952-3015.
106. Gamblin D.P., Scanlan E.M., Davis B.G., *Chemical Reviews* **2009**, 109, 131-163.
107. Schmidt R.R., Michel J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 731-732.
108. Kale R.R., McGannon C.M., Fuller-Schaefer C., Hatch D.M., Flagler M.J., Gamage S.D., Weiss A.A., Iyer S.S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1265-1268.
109. Jatczak K., Gruza M.M., Filip K., Cmoch P., Gryniewicz G., *Cent. Eur. J. Chem.* **2014**, 12, 1222-1231.
110. Appel R., *Angewandte Chemie International Edition* **1975**, 14, 801-811.
111. Baughman T.W., Sworen J.C., Wagener K.B., *Tetrahedron* **2004**, 60, 10943-10948.
112. Rad M.N.S, Behrouzb S., Khalafi-Nezhad A., *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 3445-3449.
113. Collins J.C., Hess W.W., Frank F.J., *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9, 3363-3366.
114. Kammili V.R., Reddy G.M., Mukkanti K., *Der Pharma Chemica* **2011**, 3, 141-145.
115. Bragda P.L., van Bekkumb H., Besemer A.C., *Topics in Catalysis* **2004**, 27, 49-66.
116. Csuk R., Schmuck K., Schäfer R., *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 8769-8770.
117. Dess D.B., Martin J.C., *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155-4156.
118. Meyer S.D., Schreiber S.L., *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7549-7552.
119. Hegedus L.S., Holden M.S., McKearin J.M., *Org. Synth.* **1984**, 62.
120. Manhas M.S., Hoffman W.H., Lal B., Bose A.K., *J. Chem. Soc.* **1975**, 461-463.
121. Kurosawa W., Kan T., Fukuyama T., *Org. Synth.* **2002**, 79.